

## 乙酰胆碱转移酶 (ChAT) 试剂盒说明书

(货号: G0929W 微板法 48 样)

### 一、产品简介:

乙酰胆碱转移酶(Choline acetyltransferase ChAT, EC 2.3.1.6) 是乙酰胆碱 Ach 的合成酶, 调节 Ach 的代谢。Ach 是调节食道平滑肌运动的主要的兴奋性神经递质。

ChAT 的测定是以乙酰辅酶 A 和胆碱为底物, 在 ChAT 的作用下, 反应的生成乙酰胆碱和辅酶 A, 该产物和显色剂反应于 412nm 处有吸收峰, 进而计算出 ChAT 的活力。

酶催化反应方程式:  $\text{acetyl-CoA} + \text{choline} = \text{CoA} + \text{O-acetylcholine}$ 。

### 二、试剂盒的组成和配制:

| 试剂名称 | 规格          | 保存要求     | 备注   |
|------|-------------|----------|--|
| 提取液  | 液体 60mL×1 瓶 | 4°C 保存   |  |
| 试剂一  | 粉剂 mg×1 支   | -20°C 保存 | 临用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加 1.2mL 蒸馏水溶解备用, 可-20°C 分装冻存。 |
| 试剂二  | 粉体 mg×1 支   | 4°C 保存   | 临用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加 2.3mL 蒸馏水溶解备用, -20°C 保存。    |
| 试剂三  | 液体 12mL×1 瓶 | 4°C 保存   |  |
| 试剂四  | 液体 4mL×1 瓶  | 4°C 保存   | 若凝固, 可在 25°C 水浴温育片刻至全部融解后使用。                     |
| 标准品  | 粉体 1mg×1 支  | 4°C 保存   | 若重新做标曲, 则用到该试剂。                                  |

### 三、所需的仪器和用品:

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96 孔板、研钵、冰和蒸馏水

### 四、乙酰胆碱转移酶 (ChAT) 测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

#### 1、样本制备:

① 组织样本: 取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 细菌或细胞样本: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞, 加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000 rpm, 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 ( $10^4$ ): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

#### 2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min, 调节波长到 412 nm。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C) 或于水浴锅 (25°C) 孵育 15-30min 左右。

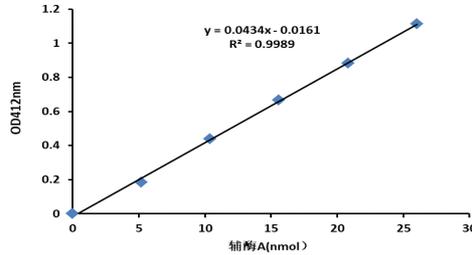
③ 在 96 孔板中依次加入:

| 试剂名称 (μL) | 测定管 | 对照管 |
|-----------|-----|-----|
| 样本        | 20  | 20  |
| 试剂一       | 20  |     |
| 试剂二       | 20  | 20  |

|  |     |     |
|--|-----|-----|
| 试剂三  | 100 | 120 |
| 混匀, 37°C 孵育 30min  |     |     |
| 试剂四  | 40  | 40  |
| 混匀, 静置 5min, 于 412nm 处读取吸光值, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本做一个自身对照)。 |     |     |

## 五、结果计算:

1、标准曲线方程为  $y = 0.0434x - 0.0161$ ;  $x$  为标准品摩尔质量 (nmol),  $y$  为  $\Delta A$ 。



2、按照样本质量计算:

酶活定义: 每克组织每分钟催化产生 1nmol 辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ChAT 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0161) \div 0.0434] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D$$

$$= 38.4 \times (\Delta A + 0.0161) \div W \times D$$

3、按照样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1nmol 辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ChAT 活性 (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0161) \div 0.0434] \div (Cpr \times V1) \div T \times D$$

$$= 38.4 \times (\Delta A + 0.0161) \div Cpr \times D$$

4、按细胞数量计算:

酶活定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1nmol 辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ChAT 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0161) \div 0.0434] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D$$

$$= 38.4 \times (\Delta A + 0.0161) \div 500 \times D$$

5、按液体体积计算:

酶活定义: 每毫升液体每分钟催化产生 1nmol 辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ChAT 活性 (nmol/min/mL)} = [(\Delta A + 0.0161) \div 0.0434] \div V1 \div T \times D = 38.4 \times (\Delta A + 0.0161) \times D$$

W---样品质量, g;

V---提取液体积, 1 mL;

V1---上清液体积 (mL), 0.02mL;

T---反应时间, 30 min;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1; 500---细胞数量, 万; 辅酶 A 的分子量---Mr=767.53;

Cpr---上清液蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (2mg/mL): 用前甩几下使粉体落入底部, 再加 0.5mL 蒸馏水溶解标准品 (母液需在两天内用完且-20°C保存)。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1mg/mL。
- 3 根据加样体系: 20 $\mu$ L 标准品+140 $\mu$ L 试剂三+40 $\mu$ L 试剂四, 于 412nm 处测定; 根据结果即可制作标准曲线。