

## 乙酰胆碱转移酶（ChAT）活性试剂盒（微板法）

产品货号：BA2877

产品规格：48样

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： $\text{acetyl-CoA} + \text{choline} = \text{CoA} + \text{O-acetylcholine}$ 。

试剂盒组成：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体60mL×1瓶	2-8°C	
试剂一	粉剂mg×1支	-20°C	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	粉剂mg×1支	2-8°C	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	2-8°C	
试剂四	液体4mL×1瓶	2-8°C	若凝固,可在25°C水浴温育片刻至全部融解后使用。
标准品	粉剂1mg×1支	2-8°C	若重新做标曲,则用到该试剂。

所需仪器和用品：

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

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);12000rpm,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,设定波长到412nm。

(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(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		



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址:郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话:400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

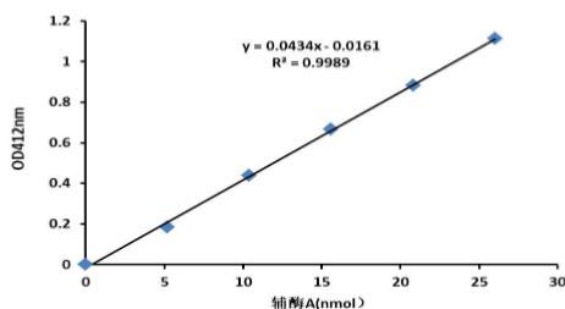
试剂四	40	40
混匀，静置5min，于412nm处读取吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照）。		

【注】：1.若 $\Delta A$ 较小，可以增加37°C保温反应时间T（如增至1小时），或增加样本量V1（由20 $\mu\text{L}$ 增至50 $\mu\text{L}$ ，则试剂三相应减少），则改变后的T和V1需重新代入公式计算。

2.  $\Delta A$ 最好控制在标准曲线的线性范围内，若 $\Delta A$ 的值超过1，可对样本进行稀释再测定，稀释倍数D代入计算公式计算；或减少样本量V1（如减至5 $\mu\text{L}$ ，则试剂三相应增加），或减少37°C反应时间T（如减至10min），则改变后的T、V1和稀释倍数D需重新代入公式计算。

### 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。

$$\begin{aligned} \text{ChAT活性(nmol/min/g鲜重)} &= [(\Delta A + 0.0161) \div 0.0434] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 38.4 \times (\Delta A + 0.0161) \div W \times D \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{ChAT活性(nmol/min/mg prot)} &= [(\Delta A + 0.0161) \div 0.0434] \div (Cpr \times V1) \div T \times D \\ &= 38.4 \times (\Delta A + 0.0161) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{ChAT活性(nmol/min/10}^4\text{cell)} &= [(\Delta A + 0.0161) \div 0.0434] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 38.4 \times (\Delta A + 0.0161) \div 500 \times D \end{aligned}$$

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，1mL；

V1---上清液体积（mL），0.02mL； T---反应时间，30min；

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 $\mu\text{L}$ 标准品+140 $\mu\text{L}$ 试剂三+40 $\mu\text{L}$ 试剂四，于412nm处测定；根据结果即可制作标准曲线。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com