Acetylcholinesterase Assay Kit

乙酰胆碱转移酶（ChAT）试剂盒说明书

货号:BN72664| 方法：可见分光法 | 规格：24 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：acetyl-CoA+choline=CoA+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 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	-20℃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，-20℃保存
试剂二	粉体 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下或离心使粉剂落入底部，再加 2.4mL 蒸馏水溶解备用，-20℃保存
试剂三	液体 27mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 4mL×1 瓶	4℃保存	若凝固，可在 25℃水浴温育片刻至全部融解后使用。
标准品	粉体 1mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、可调式移液枪、离心机、研钵。

四、乙酰胆碱转移酶（ChAT）测定：

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℃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：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℃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 可见分光光度计预热 30min，调节波长到 412 nm，蒸馏水调零。

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

③ 在 EP 管中依次加入：

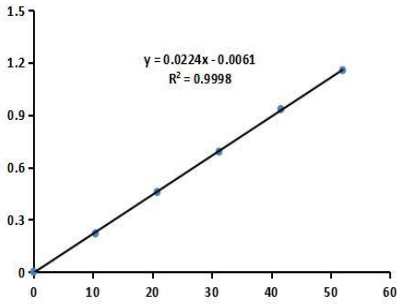
试剂名称（μL）	测定管	对照管
样本	80	80
试剂一	40	
试剂二	40	40

试剂三	500	540
混匀，37℃孵育 30min		
试剂四	80	80
混匀，静置 5min，将所有液体转移至 1mL 比色皿中，于 412nm 处读取吸光值，ΔA=A 测定-A 对照（每个样本做一个自身对照）。		

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算：

1、标准曲线方程为 y = 0.0224x - 0.0061；x 为标准品摩尔质量（nmoL），y 为△A。



标准曲线示意图

说明：标准曲线由标准品测定获得，具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

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。

ChAT 活性(nmoL/min/g 鲜重)=[(ΔA+0.0061)÷0.0224]÷(W×V1÷V)÷T×D

=18.6×(ΔA+0.0061)÷W×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。

ChAT 活性(nmoL/min/mg prot)=[(ΔA+0.0061)÷0.0224]÷(Cpr×V1)÷T×D

=18.6×(ΔA+0.0061)÷Cpr×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。

ChAT 活性(nmoL/min/10^4 cell)=[(ΔA+0.0061)÷0.0224]÷(500×V1÷V)÷T×D

=18.6×(ΔA+0.0061)÷500×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。

ChAT 活性(nmoL/min/mL)=[(ΔA+0.0061)÷0.0224]÷V1÷T×D =18.6×(ΔA+0.0061)×D

W---样品质量，g；　　V---提取液体积，1 mL；

V1---上清液体积（mL），0.08mL；　　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。