



乙酰胆碱转移酶（ChAT）测试盒说明书

（货号：A079-1-1 测组织 40 管/20 样）

免责声明：测试前请仔细阅读说明书，预试后再进行批量实验，否则由此导致的后果用户自行承担！

一、测定原理：

乙酰胆碱转移酶(choline acetyltransferase ChAT)的测定是以乙酰辅酶 A 和胆碱为底物，在 ChAT 的作用下，反应的生成物和显色剂结合，在 324nm 处测定吸光度，以此计算 ChAT 的活力。

二、试剂组成与配制：（试剂盒有效期 3 个月）

试剂一：液体 6mL×1 瓶，4℃ 保存。室温低时会有结晶析出，测试前 37℃ 水浴至澄清。

试剂二：粉剂×1 支，临用前加 220μL 的蒸馏水，充分溶解；用不完的试剂-20℃ 以下保存。

试剂三：粉剂×1 支，临用时每支加双蒸水 440μL，用不完的试剂-20℃ 以下保存。

试剂四：液体×2 支，临用前每支用双蒸水 1:1 稀释，4℃ 保存。

试剂五：液体×1 支，4℃ 保存。

试剂六：液体×1 支，4℃ 保存。

试剂七：液体×1 支，4℃ 保存。

三、所需仪器及试剂：

可调 324nm 的紫外分光光度计及 1cm 光径（2mm 内径）石英比色皿，涡旋混匀器，37℃ 水浴锅（或恒温箱），费水浴锅，离心机，双蒸水（或蒸馏水），蛋白测定试剂（用蛋白浓度计算时可用，试剂盒本公司有售）。

四、操作步骤：

1、样本前处理：

10%匀浆液的制备：准确称取组织重量，按重量（g）：体积（mL）=1:9 的比例，加入 9 倍体积的生理盐水，2500 转/分，离心 10 分钟，取上清液，再用生理盐水 2 倍稀释后测定；

2、操作表：

	测定管	对照管
试剂一（μL）	105	105
试剂二（μL）	5	5
试剂三（μL）	10	10
试剂四（μL）	10	10
试剂五（μL）	10	10
试剂六（μL）	10	10
混匀，37℃ 水浴预温 5 分钟		
5%的组织匀浆上清（μL）	25	（煮沸的匀浆上清）25
混匀，37℃ 水浴 20 分钟，100℃ 沸水水浴 2 分钟终止反应		
蒸馏水（μL）	425	425
混匀，4000 r/min×10min 离心后取上清进行显色反应		
上清（μL）	500	500
试剂七（μL）	10	10
混匀，静置 15 分钟，在 324nm 处，用 1cm 光径，2mm 内径的石英比色皿，蒸馏水调零，测定各管的吸光度值。		

注：试剂一、二、三、四、五、六可提前按比例及需要量混合好，到时直接加它们的混合液 150μL 进行操作。

五、计算方法及举例：

1、酶单位定义：在 pH7.2 条件下，37℃ 时每克组织（或每克组织蛋白）每分钟转移 1μmol 乙酰基给胆碱的能力定义为一个酶活力单位。

2、计算公式：

$$\text{ChAT 活力 (U/g 组织)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{T \times 1.98 \times 10^{-2} \times d} \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \div \frac{W}{V_{\text{样总}}}$$

$$\text{ChAT 活力 (U/mgprot)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{T \times 1.98 \times 10^{-2} \times d} \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \div \text{Cpr}$$

以上公式中，

T:反应时间,20 分钟;

V_{反应}:反应体系总体积,600μL;

1.98×10⁻²:呈色物消光摩尔系数 1.98×10⁻⁵×比色光径(1cm)×1000;

d:比色光径,1cm;

V_样:取样量,25μL;

W:样本质量,g;

V_{样总}:提取液总体积,mL;

Cpr:组织匀浆蛋白浓度,mgprot/mL (prot 指蛋白)。

六、测定意义：

乙酰胆碱 Ach 是调节食道平滑肌运动的主要的兴奋性神经递质。食道平滑肌收缩主要是由于 Ach 释放引起。而乙酰胆碱转移酶(Choline acetyltransferase ChAT)和乙酰胆碱脂酶(Acetylcholinesterase ACHE)分别是 Ach 的合成酶和水解酶，调节 Ach 的代谢。食道组织中这两个酶的活力代表了食管内源性胆碱能神经功能状态。

乙酰胆碱是延髓脊髓运动神经元，自主神经系统神经节前纤维，神经节后胆碱能（副交感神经）纤维，以及中枢神经系统内许多神经元（例如基底节，大脑运动区皮层）的主要神经递质。它是通过胆碱乙酰转移酶的作用，由胆碱与来自线粒体的乙酰辅酶 A 所合成。在获得释放后，乙酰胆碱刺激特殊的胆碱能受体，这种相互作用很快被局部的胆碱酯酶所终止，后者使乙酰胆碱被水解为胆碱与乙酸盐。乙酰胆碱的水平由胆碱乙酰转移酶和胆碱的摄取所调控。