

乙酰胆碱转移酶 (ChAT) 测试盒

(货号: BC145 测组织 40 管/20 样)

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°C 保存。室温低时会有结晶析出, 测试前 37°C 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°C 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°C 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°C 保存。

试剂五: 液体×1 支, 4°C 保存。

试剂六: 液体×1 支, 4°C 保存。

试剂七: 液体×1 支, 4°C 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°C 水浴锅 (或恒温箱), 沸水浴锅, 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°C 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°C 水浴 20 分钟, 100°C 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 75μL 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°C 时每克组织(或每克组织蛋白)每分钟转移 1 μ mol 乙酰基给胆碱的能力定义为一个酶活力单位。

2、计算公式:

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

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

以上公式中,

T:反应时间,20 分钟;

$V_{\text{反总}}$:反应体系总体积,600 μ L;

1.98×10^{-2} : 呈色物消光摩尔系数 $1.98 \times 10^{-5} \times$ 比色光径(1cm) $\times 1000$;

$V_{\text{样}}$:取样量,25 μ L;

W:样本质量,g;

$V_{\text{样总}}$:提取液总体积,mL;

Cpr: 组织匀浆蛋白浓度, mgprot/mL (prot 指蛋白)。

3、计算举例:

取正常大鼠 10%脑组织匀浆(即取大鼠脑组织 0.25g 加 2.25mL 的生理盐水制成 10% 的脑匀浆), 再用生理盐水 2 倍稀释后, 取样 25 μ L 进行 ChAT 检测, 测得测定管吸光度为 0.354, 对照管吸光度为 0.260, 计算 ChAT 活力为:

$$\begin{aligned} \text{ChAT 活力 (U/g 组织)} &= \frac{0.354 - 0.260}{20 \times 1.98 \times 10^{-2}} \times \frac{600}{25} \times 2 \div \frac{0.25}{2.25} \\ &= 102.55 \text{U/g 组织} \end{aligned}$$

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)和乙酰胆碱酯酶(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。