（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-K125-M

产品规格：48T(24 samples)/96T(48 samples)

检测仪器：酶标仪(324 nm)

Elabscience®乙酰胆碱转移酶（ChAT）比色法测试盒（组织样本）

Choline Acetyltransferase (ChAT) Activity Assay Kit (Tissue Samples)

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100
邮箱：biochemical@elabscience.cn
网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测各种动物组织中的 ChAT 活力。

检测原理

乙酰胆碱转移酶（ChAT）是以乙酰辅酶 A 和胆碱为底物，产生辅酶 A（CoA），CoA 和显色剂 4，4-二硫代吡啶结合，在 324nm 处测定吸光度，以此计算 ChAT 的活力。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48T)	规格 2 (Size 2)(96T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	13 mL×1 瓶	26 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 3 个月
试剂二 (Reagent 2)	抑制剂 (Inhibitor)	1.2 mL×1 支	1.2 mL×1 支	-20℃ 保存 3 个月
试剂三 (Reagent 3)	基质 A (Substrate A)	粉剂×1 支	粉剂×1 支	-20℃ 保存 3 个月
试剂四 (Reagent 4)	基质 B (Substrate B)	1.2 mL×1 支	1.2 mL×2 支	2-8℃ 保存 3 个月
试剂五 (Reagent 5)	促进剂 A (Accelerant A)	3 mL×1 瓶	3 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 3 个月
试剂六 (Reagent 6)	促进剂 B (Accelerant B)	1.2 mL×1 支	1.2 mL×2 支	-20℃ 保存 3 个月
试剂七 (Reagent 7)	显色剂 (Chromogenic Agent)	2 mL×1 瓶	2 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 3 个月
	96 孔紫外酶标板	96 孔×1 块		无要求
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪（324 nm），水浴锅（100℃）

试剂准备

① 试剂平衡至室温。

② 试剂三工作液的配制：

每支试剂三用2.4 mL双蒸水溶解，除待用部分，其他溶液分装，-20℃保存三个月。

③ 基质工作液的配制：如下表（基质工作液配制完成后，2-8℃保存3 h，请临用前配制）

	试剂一	**试剂二**	**试剂三工作液**	**试剂四**	**试剂五**	**试剂六**
基质工作液 (μL)	210×(2n+2)	10×(2n+2)	20×(2n+2)	20×(2n+2)	20×(2n+2)	20×(2n+2)

注：n 为所需测定的样本数，+2 是表示多配制 2 管，避免吸取到最后试剂不够。

样本准备

① 样本处理

组织样本：匀浆介质为生理盐水或 PBS（0.01 M，pH 7.4），进行匀浆后，4°C 10000 × g，离心 10 min 取上清待测。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：1.21-40 U/g组织湿重，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
20%小鼠脑组织	1-2 倍	20%小鼠肾脏组织	不稀释
20%大鼠心脏组织	不稀释	20%大鼠肺组织	不稀释
20%大鼠肝脏组织	不稀释	20%大鼠心脏组织	不稀释

注：稀释液为生理盐水或 PBS（0.01 M，pH 7.4）。

实验关键点

① 操作步骤⑦离心完毕，如发现有浑浊，需再进行离心。

② 操作步骤⑧吸取上清进行显色时，注意不要吸出杂质。

操作步骤

① 对照管：取 50 μL 待测样本，加到 2 mL EP 管中并封口；

② 将步骤①中的对照管放入沸水中水浴 2 min。

③ 配制好的基质工作液，37℃预温 5 min，并向测定管、对照管加 300 μL。

④ 向步骤③中测定管加入 50 μL 待测样本。

⑤ 混匀后，37℃孵育 20 min，沸水浴 2 min 终止反应。

⑥ 向步骤⑤中各管加入 850 μL 双蒸水。

⑦ 混匀后，3500 × g，离心 10 min。

⑧ 离心完成后，取 750 μL 上清，至新的 2 mL EP 管中（做好标记）

⑨ 向步骤⑧中各管加入 15 μL 试剂七。

⑩ 混匀，静置 15 min，取 250 μL 于紫外酶标板对应孔，酶标仪 324 nm 处检测，测定各孔的 OD 值。

操作表

	测定管	**对照管**
待测样本(μL)	--	50
沸水中水浴 2 min		
预温 5 min 的基质工作液(μL)	300	300
待测样本(μL)	50	--
混匀，37℃孵育 20 min，沸水浴 2 min 终止反应		
双蒸水(μL)	850	850
混匀，3500 × g，离心 10 min，取上清液		
上清液(μL)	750	750
试剂七(μL)	15	15
混匀，静置 15 min，取 250 μL 于紫外酶标板对应孔，酶标仪波长 324 nm 处检测，测定各孔的 OD 值。		

结果计算

动物组织等样本中的 ChAT 活力：

定义：在 37℃，pH7.2 的条件下，每克湿重组织每分钟转移 1 nmol 乙酰基给胆碱的能力定义为一个酶活力单位。

$$\text{组织中 ChAT 活力（U/g 组织湿重）} = \frac{A_2\text{-}A_1}{t \times \varepsilon \times d} \times \frac{V_2}{V_1} \div \frac{m}{V_3}$$

注解:

A_1：对照管 OD 值

A_2：测定管 OD 值

t：酶促反应时间（20 min）

ε：1.98×10^{-5} L/（nmol·cm）（显色物质在 324 nm 处的纳摩尔吸光系数）

d：比色光径（0.7 cm）

V_1：样本体积（50 μL）

V_2：反应总体积（1200 μL）

V_3：样本制备时，加入匀浆介质的体积（L）

m：样本制备时，称取样本的质量（g）

附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	1.21-40 U/g 组织湿重	**平均批间差**	9.4 %
灵敏度	1.21 U/g 组织湿重	**平均批内差**	5.1 %

附录2 实例分析

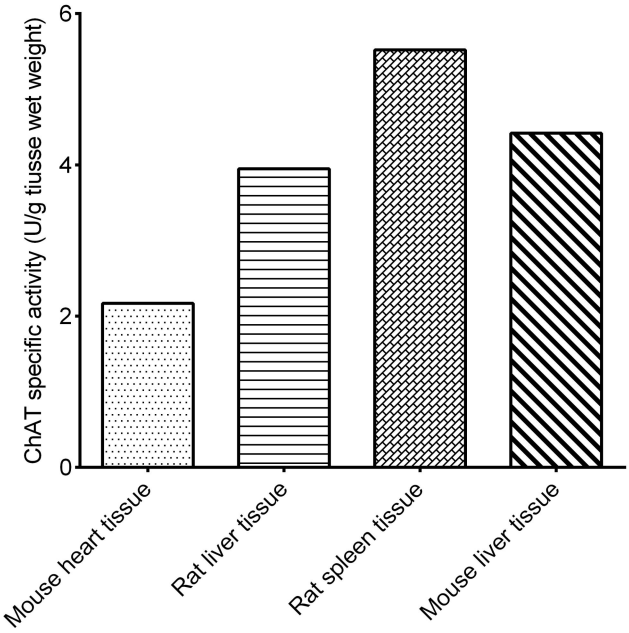
例如检测小鼠心肌组织(数据仅供参考):

取50 μL 20%小鼠心肌组织匀浆，按照操作表检测，结果如下：

测定孔平均OD值为0.085，对照孔平均OD值为0.078，计算结果为：

$$\text{ChAT活力（U/g 组织湿重）} = \frac{0.085-0.078}{20\times1.98\times0.7}\times100000\times1200\div50\div0.2\times0.8\div1000 = 2.42\ \text{U/g 组织湿重}$$

按照操作过程，测定小鼠心肌组织（20%组织匀浆，加样量50 μL）、大鼠肝组织（20%组织匀浆，加样量50 μL）、大鼠脾组织（20%组织匀浆，加样量50 μL）、小鼠肝组织（20%组织匀浆，加样量50 μL）中ChAT活力（如下图）：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
复孔差异大	取上清时，混入了杂质	取上清时需小心
	试剂七加入量不同	保持试剂七加入量一样
样本测不出值	样本稀释倍数太大	选择合适的稀释倍数，重新检测
	样本保存时间过长或保存不当	取新鲜样本，重新检测
样本测量结果＞40 U/g 组织湿重	样本浓度太高	选择合适的稀释倍数，重新检测

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。