

乙酰胆碱（Ach）含量测定试剂盒说明书

（货号：ADS-W-T028 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

乙酰胆碱（Ach）是研究最早的神经递质，是许多周围神经如运动神经、植物性神经系统节前纤维和副交感神经节后纤维的兴奋性神经递质。乙酰胆碱与底物液反应，通过显色反应生成棕色化合物，测定其吸光度 OD 值，其颜色深浅与乙酰胆碱浓度成正比。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉剂 1 瓶	4℃ 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 向试剂瓶中加入 6mL 蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 5mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂三	液体 4mL×1 瓶	4℃ 避光保存	
试剂四	四 A：粉体 4 支 四 B：液体 5mL×1 瓶	4℃ 避光保存	每支： 1. 临用前每支四 A 中加 1.2mL 的四 B 溶解混匀后备用； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	粉体 1 支	4℃ 避光保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

混合液制备：临用前将试剂一：试剂二=1:1 混合制成混合液备用。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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（10⁴）：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、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min，调节波长到 540 nm。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）。在 EP 管中依次加入：

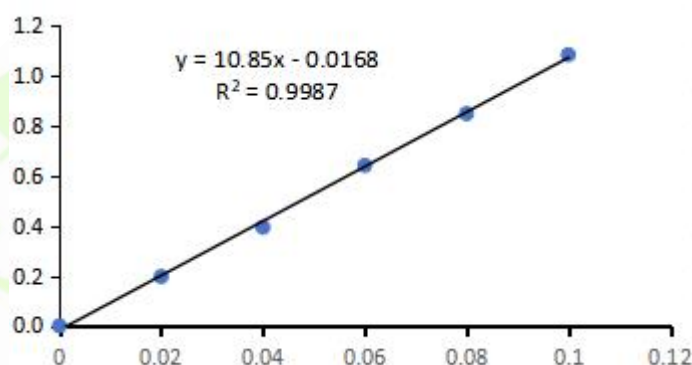
试剂组分 (μL)	测定管	空白
样本	50	
水	50	100
混合液	100	100
混匀，室温孵育 15min		
试剂三	40	40
试剂四	40	40
摇晃 EP 管，充分混匀 2min 后立即取 200μl 至 96 孔板中于 540nm 处读值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

【注】1. 若 ΔA 较小，可以增加样本量 V_1 （由 50μL 增至 100μL，则水相应减少），则改变后的 V_1 需重新代入公式计算。

2. ΔA 最好控制在标准曲线的线性范围内，若 ΔA 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 V_1 （如减至 10μL，则水相应增加），则改变后的 V_1 和稀释倍数 D 需重新代入公式计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程为 $y = 10.85x - 0.0168$ ； x 为标准品质量（mg）， y 为 ΔA 。



2、按照样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{乙酰胆碱含量(mg/g 重量)} &= [(\Delta A + 0.0168) \div 10.85] \div (W \times V_1 \div V) \times D \\ &= 1.843 \times (\Delta A + 0.0168) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按照样本蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{乙酰胆碱含量(mg/mg prot)} &= [(\Delta A + 0.0168) \div 10.85] \div (Cpr \times V_1 \div V) \times D \\ &= 1.843 \times (\Delta A + 0.0168) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{乙酰胆碱含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0168) \div 10.85 \times 10^3] \div (500 \times V_1 \div V) \times D \\ &= 1843 \times (\Delta A + 0.0168) \div 500 \times D \end{aligned}$$

5、按液体体积计算：

$$\text{乙酰胆碱含量(mg/mL)} = [(\Delta A + 0.0168) \div 10.85] \div V_1 \times D = 1.843 \times (\Delta A + 0.0168) \times D$$

W---样品质量, g; V---提取液体积, 1 mL;
V1---上清液体积 (mL), 0.05mL; 500---细胞数量, 万;
D---稀释倍数, 未稀释即为 1;
Cpr---蛋白浓度 (mg/mL); 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

1 称取 2mg 标准品至 EP 管中, 加入 1mL 水溶解成 2mg/mL 标准品母液, (现配现用, 两天内用完), 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2 mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下:

标品浓度 mg/mL	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据测定管加样表操作, 根据结果, 以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值, 过 0 点制作标准曲线。

试剂组分 (μL)	测定管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	50	
蒸馏水	50	100
混合液	100	100
混匀, 室温孵育 15min		
试剂三	40	40
试剂四	40	40
摇摇晃 EP 管, 充分混匀 2min 后立即取 200μl 至 96 孔板中于 540nm 处读值, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{0 浓度管}}$ 。		