

乙酰胆碱 (Ach) 含量测定试剂盒说明书

(货号: ADS-F-T028 分光法 24 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 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 1 瓶	4°C保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 再向试剂中加入 5mL 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°C保存	
试剂三	液体 4mL×1 瓶	4°C避光保存	
试剂四	四 A: 粉体 3 支 四 B: 液体 4mL×1 瓶	4°C避光保存	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°C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)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、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°C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°C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、检测步骤:

① 分光光度计预热 30min, 调节波长到 540 nm。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C)。在 EP 管中依次加入:

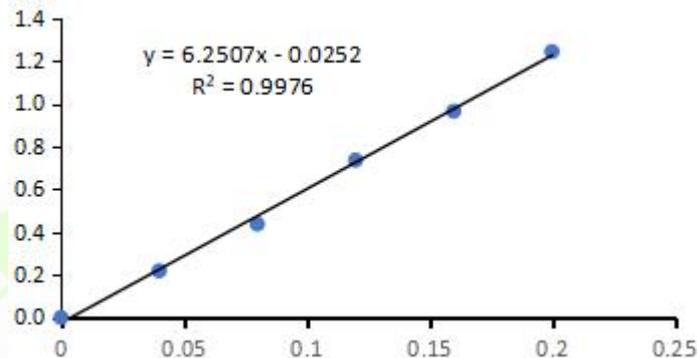
试剂组分 (μL)	测定管	空白
样本	100	
水	200	300
混合液	300	300
混匀, 室温孵育 15min		
试剂三	150	150
试剂四	100	100
摇晃 EP 管, 充分混匀 2min, 立即将全部澄清液体转移至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中于 540nm 处读值, ΔA=A 测定-A 空白。		

【注】1.若ΔA 较小, 可以增加样本量 V1 (由 100μL 增至 200μL, 则水相应减少), 则改变后的 V1 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 1.2, 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 V1 (如减至 50μL, 则水相应增加), 则改变后的 V1 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 $y = 6.2507x - 0.0252$; x 为标准品质量 (mg), y 为 ΔA。



2、按照样本质量计算:

$$\begin{aligned} \text{乙酰胆碱含量(mg/g 重量)} &= [(\Delta A + 0.0252) \div 6.2507] \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 1.6 \times (\Delta A + 0.0252) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按照样本蛋白浓度计算:

$$\begin{aligned} \text{乙酰胆碱含量(mg/mg prot)} &= [(\Delta A + 0.0252) \div 6.2507] \div (Cpr \times V1 \div V) \times D \\ &= 1.6 \times (\Delta A + 0.0252) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算:

$$\begin{aligned} \text{乙酰胆碱含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0252) \div 6.2507 \times 10^3] \div (500 \times V1 \div V) \times D \\ &= 1600 \times (\Delta A + 0.0252) \div 500 \times D \end{aligned}$$

5、按液体体积计算:

$$\text{乙酰胆碱含量(mg/mL)} = [(\Delta A + 0.0252) \div 6.2507] \div V1 \times D = 1.6 \times (\Delta A + 0.0252) \times D$$

W---样品质量, g;

V---提取液体积, 1 mL;

V1---上清液体积 (mL), 0.1mL;

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	100	
蒸馏水	200	300
混合液	300	300
混匀，室温孵育 15min		
试剂三	150	150
试剂四	100	100
摇晃 EP 管，充分混匀 2min，立即将全部澄清液体转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中于 540nm 处读值， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		