

乙酰胆碱(Ach)含量测定试剂盒

货号: BRK0031

一、产品简介:

| | |
|------|--|
| 描述 | 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。 |
| 检测范围 | 0.1-5mg/mL |
| 灵敏度 | 0.1mg/mL |
| 检测方法 | 微板法 |
| 保质期 | 2-8°C, 避光保存3个月 |
| 供应限制 | 仅供科研使用 |

二、试剂盒的组成和配制:

| 试剂名称 | 规格 | 保存要求 | 备注 |
|------|---------------------------|-------|-----------------------------------|
| 提取液 | 液体100mL×1瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂一 | 粉剂mg×1瓶 | 4°C保存 | 临用前甩几下使粉剂落入底部, 再向试剂中加入6mL蒸馏水溶解备用。 |
| 试剂二 | 液体5mL×1瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂三 | 液体4mL×1瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂四 | 四A: mg×4支 四B: 液体5mL×1瓶 | 4°C保存 | 临用前每支四A中加1.2mL的四B溶解混匀后备用。 |
| 标准品 | 粉体mg×1支 | 4°C保存 | 若重新做标曲则用到该试剂。 |

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、所需的仪器和用品：

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

四、乙酰胆碱(Ach)含量测定：

建议正式实验前选取2个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

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）；12000rpm，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(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、上机检测：

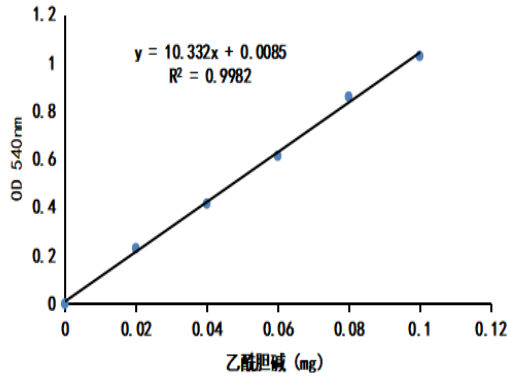
① 酶标仪预热30min，调节波长到540 nm。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）。在EP管中依次加入：

| 试剂名称 (μL) | 测定管 | 空白 (仅做一次) |
|--|-----|-----------|
| 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澄清液体（若浑浊可室温条件下于8000rpm离心5min）至96孔板中，于540nm处读值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。 | | |

五、结果计算：

1、标准曲线方程为 $y = 10.332x + 0.0085$ ； x 为标准品质量 (mg)， y 为 ΔA 。



2、按照样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{乙酰胆碱含量(mg/g重量)} &= [(\Delta A - 0.0085) \div 10.332] \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 1.936 \times (\Delta A - 0.0085) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{乙酰胆碱含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A - 0.0085) \div 10.332 \times 10^3] \div (500 \times V1 \div V) \times D \\ &= 1936 \times (\Delta A - 0.0085) \div 500 \times D \end{aligned}$$

4、按液体体积计算：

$$\text{乙酰胆碱含量(mg/mL)} = [(\Delta A - 0.0085) \div 10.332] \div V1 \times D = 1.936 \times (\Delta A - 0.0085) \times D$$

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；

附：标准曲线制作过程：

- 标准品浓度 (20mg/mL)：直接加入 1mL 蒸馏水溶解成 20mg/mL (现配现用，两天内用完)。
- 把标准品用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 以上面不同浓度点为横坐标 (x)，对应的 ΔA 标准为纵坐标 (y) 绘制标准曲线，得到线性回归方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 测定带入公式中计算 x (mg/mL)。