

## 乙酰胆碱 (Ach) 含量测定试剂盒说明书

(货号: G0930F 分光法 24 样)

### 一、产品简介:

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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 30mL×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 5mL 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×3 支 四 B: 液体 4mL×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:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、可调式移液枪、离心机、研钵。

### 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°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、上机检测:

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:

试剂名称 (μL)	测定管	空白 (仅做一次)
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 (若浑浊		

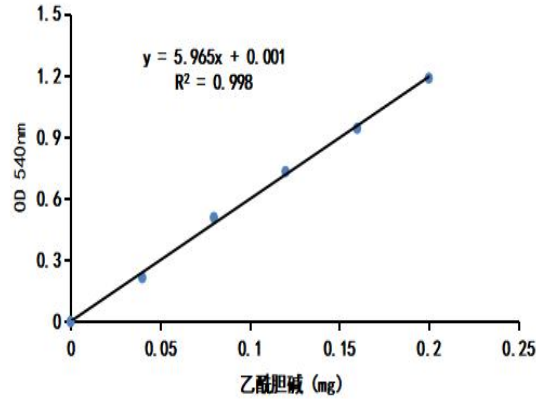
可室温条件下于 8000rpm 离心 5min) 转移至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 于 540nm 处读数,  $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。

【注】1. 若  $\Delta A$  较小, 可以增加样本量  $V_1$  (由 100 $\mu\text{L}$  增至 200 $\mu\text{L}$ , 则水相应减少), 则改变后的  $V_1$  需重新代入公式计算。

2.  $\Delta A$  最好控制在标准曲线的线性范围内, 若  $\Delta A$  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  $V_1$  (如减至 50 $\mu\text{L}$ , 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  $y = 5.965x + 0.001$ ;  $x$  为标准品质量 (mg),  $y$  为  $\Delta A$ 。



2、按照样本质量计算:

$$\begin{aligned} \text{乙酰胆碱含量 (mg/g 重量)} &= [(\Delta A - 0.001) \div 5.965] \div (W \times V_1 \div V) \times D \\ &= 1.676 \times (\Delta A - 0.001) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按细胞数量计算:

$$\begin{aligned} \text{乙酰胆碱含量 } (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A - 0.001) \div 5.965 \times 10^3] \div (500 \times V_1 \div V) \times D \\ &= 1676 \times (\Delta A - 0.001) \div 500 \times D \end{aligned}$$

4、按液体体积计算:

$$\text{乙酰胆碱含量 (mg/mL)} = [(\Delta A - 0.001) \div 5.965] \div V_1 \times D = 1.676 \times (\Delta A - 0.001) \times D$$

W---样品质量, g;

V---提取液体积, 1 mL;

$V_1$ ---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;

附: 标准曲线制作过程:

- 1 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)。
- 2 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。
- 3 依据测定管加样体系, 于 540nm 处测定; 根据结果即可制作标准曲线。