

乙酰胆碱 (Ach) 含量测定试剂盒说明书

(货号: G0930W96 微板法 96 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 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°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 酶标仪预热 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 | 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 | | |

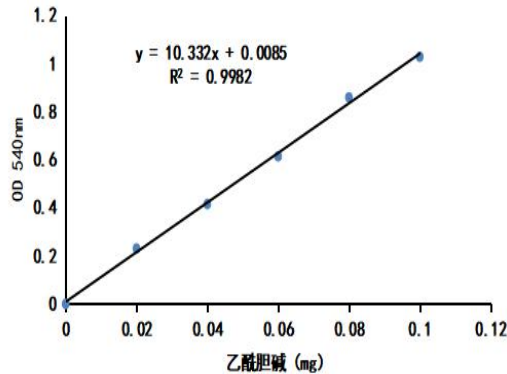
浑浊可室温条件下于 8000rpm 离心 5min) 至 96 孔板中,
于 540nm 处读值, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。

【注】1. 若 ΔA 较小, 可以增加样本量 V_1 (由 50 μL 增至 100 μL , 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 10 μL , 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 $y = 10.332x + 0.0085$; x 为标准品质量 (mg), y 为 ΔA 。



2、按照样本质量计算:

$$\begin{aligned} \text{乙酰胆碱含量}(\text{mg/g 重量}) &= [(\Delta A - 0.0085) \div 10.332] \div (W \times V_1 \div V) \times D \\ &= 1.936 \times (\Delta A - 0.0085) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按细胞数量计算:

$$\begin{aligned} \text{乙酰胆碱含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A - 0.0085) \div 10.332 \times 10^3] \div (500 \times V_1 \div V) \times D \\ &= 1936 \times (\Delta A - 0.0085) \div 500 \times D \end{aligned}$$

4、按液体体积计算:

$$\text{乙酰胆碱含量}(\text{mg/mL}) = [(\Delta A - 0.0085) \div 10.332] \div V_1 \times D = 1.936 \times (\Delta A - 0.0085) \times D$$

W---样品质量, g;

V---提取液体积, 1 mL;

V_1 ---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:

- 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。