



乙酰胆碱 (Ach) 测试盒说明书(精简版)

(货号: A105-1-1 测组织 48T)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书, 测试后再进行批量实验,

否则由此导致的后果用户自行承担!

一、试剂组成及配制: (试剂盒有效期 3 个月)**试剂一:** 工作液: 甲粉×2 支, 甲粉溶剂 3.5mL×2 瓶; 乙液 3.5mL×2 瓶, 4℃ 保存。临用前将一支甲粉加入到一瓶甲粉溶剂中配成甲液 (4℃ 可保存 1 个月), 按甲液: 乙液=1: 1 的混合后配成试剂一工作液, 按需要量配制。**试剂二:** 终止剂, 6mL×1 瓶, 4℃ 保存。**试剂三:** 显色剂, 6mL×1 瓶, 4℃ 避光冷藏保存。**试剂四:** 澄清剂, 10mL×1 瓶, 低温会凝固, 用前 37℃ 水浴 5 分钟以上溶解完全, 澄清透亮后使用。**试剂五:** Ach 标准品粉剂×3 支, 标准品稀释液 10mL×1 瓶。临用前取 0.25mL 标准品稀释液加入到一支标准品粉剂中配成 10mg/mL 标准应用液, 混匀溶解完全(制备标准曲线可用)。再取 10mg/mL 标准应用液 100μL 加 900μL 标准品稀释液, 混匀后即成为 1mg/mL 标准应用液, 4℃ 保存不超过 3 天。**试剂六:** 提取液, 100mL×1 瓶, 4℃ 保存。**二、所需仪器:**

酶标仪 (550nm)、微量移液器、漩涡混匀器、低速离心机、37℃ 水浴/气浴箱

三、操作步骤:**1、样本前处理:** 准确称量组织重, 按重量 (g): 体积 (mL)=1: 9 加试剂六进行组织匀浆 (例如 0.1g 组织 +0.9mL 试剂六), 2500~3500 转/分钟, 离心 10 分钟, 取上清待测。**2、操作表:**

	空白管	标准管	测定管	对照管
双蒸水(μL)	50	40		
1mg/mL Ach 标准品(μL)		10		
待测样本(μL)			25	25
试剂一工作液(μL)	100	100	100	100
混匀, 室温静置 15 分钟				
试剂二终止剂(μL)	50	50	50	50
试剂三显色剂(μL)	50	50	50	50
试剂一工作液(μL)				100
试剂四澄清剂(μL)			25	25
混匀, 静置 10 分钟, 550nm 处, 取 200μL 于 96 孔板在 550nm 处酶标仪测定各孔 OD 值。				

四、组织中乙酰胆碱的计算公式:

$$\text{ACH 含量} (\mu\text{g/g 组织}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N \div \frac{W}{V_{\text{样总}}}$$

或

$$\text{ACH 含量} (\mu\text{g/mgprot}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N \div \text{Cpr}$$

C_{标准}: 标准品浓度, 400μg/mL (取样 25μL, 1mg/mL 标准试剂加样 10μL, 即 2.5 倍稀释);**N:** 样本测试前稀释倍数;**W:** 组织重量, g;**V_{样总}:** 样本前处理时加的试剂六的体积, mL;**Cpr:** 组织匀浆蛋白浓度, mgprot/mL。**五、本法优点:**

1、灵敏度高, 与传统的 Ach 含量测定方法相比, 此方法仅需微量样品即可测出乙酰胆碱 (Ach) 的水平。

2、操作方法简便、快速, 测定结果准确稳定。

六、测定原理:

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。

七、检测意义:

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。测定血中乙酰胆碱含量对判定植物神经功能及其在某些疾病如支气管哮喘、慢性支气管炎、湿疹、溃疡病等的发病中的作用具有一定意义。

附录 I: Ach 标准曲线的制作**1、标准品的配制:**

取 10mg/mL 标准品应用液用标准品稀释液分别稀释成 5mg/mL、2.5mg/mL、1.25mg/mL、0.625mg/mL、0.5mg/mL、0.3125mg/mL、0mg/mL 按照下表操作:

2、操作表:

管号	1	2	3	4	5	6	7	8
标准品浓度 (mg/mL)	0	0.3125	0.5	0.625	1.25	2.5	5	10
标准品加入量(μL)		10	10	10	10	10	10	10
双蒸水(μL)	50	40	40	40	40	40	40	40
试剂一工作液(μL)	100	100	100	100	100	100	100	100
混匀, 室温静置 15 分钟								
试剂二终止剂(μL)	50	50	50	50	50	50	50	50
试剂三显色剂(μL)	50	50	50	50	50	50	50	50
混匀, 取 0.2mL 加到 96 孔板中, 550nm 处, 酶标仪测定各孔 OD 值								

3、检测结果:

以所测得的绝对吸光度为纵坐标, 以相应的标准品浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

