

乙酰胆碱 (Ach) 含量 检测试剂盒微板法

使用说明书

产品货号: BP10194W

注意: 请在试剂盒保质期内使用, 具体保质期见外包装标签。

本产品仅供科学研究使用, 不能用于临床诊断。

检测范围: 0.1-5mg/mL

灵敏度: 0.1mg/mL

有效期: 6个月

保存温度: 2-8℃

检测原理:

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。

注意事项:

1. 不能使用过期产品, 不同货号 and 批号组分不得混用。
2. 本试剂开封后请尽快使用, 以免空气、采样污染引起试剂变质。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 如果可能传播疾病, 所有的样品都应管理好, 按照规定的程序处理样品和检测装置。
5. 试剂严格按保存条件保存, 不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂, 使用前请先离心, 以免量取不到足够量的试剂。试剂盒中如有提供粉剂, 使用前请甩几下, 使粉剂落入底部。

试剂盒组分：

试剂名称	规格（48T/40S）	规格（96T/88S）	保存条件
提取液	50mL×1 瓶	100mL×1 瓶	2-8℃
试剂一	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃，避光
试剂二	2.5mL×1 瓶	5mL×1 瓶	2-8℃
试剂三	2mL×1 瓶	4mL×1 瓶	2-8℃
试剂四（A）	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃，避光
试剂四（B）	3mL×1 瓶	6mL×1 瓶	2-8℃
标准品	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃

所需仪器耗材及试剂：

离心机、酶标仪、可调式移液器、蒸馏水。

样本处理及要求:

1. **试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围**, 建议实验前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定, 根据预实验的结果, 结合本试剂盒的线性范围: 0.1-5mg/mL, 如果样品中待测物浓度过高或过低, 请对样本做适当的稀释或浓缩, 样本的稀释液为提取液。
2. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中, 建议做预实验验证其检测有效性。
3. **细菌、细胞或组织样品的制备**: 细菌或培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 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); 10000 g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
4. **组织样本**: 按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液), 进行冰浴匀浆。10000 g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
5. **血清 (浆) 等液体样本**: 直接测定。若浑浊, 离心后取上清检测。

检测前准备工作:

1. 请提前取出试剂盒，平衡至室温，
2. 试剂一：临用取一瓶加入 3mL 蒸馏水充分溶解。
3. 试剂四：使用前取一瓶试剂四 A 加试剂四 B 液 1.2ml 溶解，溶解后为试剂四。
4. 工作液配制：将溶解好的试剂一和试剂二按体积比=1:1 混合均匀，现配现用。
5. **标准品溶液的配制**：使用前取一瓶加 2ml 蒸馏水，配置成 10mg/mL 标准品母液。把标准品母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品：0、0.1、0.5、1、1.5、2、2.5、3mg/mL。（注：配制目标浓度的标准品工作液时，每次请根据表格从标准品母液中取对应的体积与相应稀释液混合均匀后使用。）

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mg/mL)	0	0.1	0.5	1	1.5	2	2.5	3
10mg/mL 标准品(μL)	0	5	25	50	75	100	125	150
蒸馏水(μL)	500	495	475	450	425	400	375	350

也可根据实际样本来调整标准品浓度。按照标准管加样体系操作，依据结果即可制作标准曲线；本说明书中的标曲是用蒸馏水稀释得出，若选取其他稀释液可选择重做标曲。

操作步骤:

1. 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 540nm。
2. 样本测定 (在 EP 管中依次加入):

试剂名称(μ L)	测定管	标准管
样本	100	
不同浓度标准品		100
工作液	100	100
混匀, 室温静止 10min		
试剂三	40	40
试剂四	40	40
混匀, 静止 2min, 如果混浊, 则室温 8000rpm 离心 5min 取上清, 取 200 μ L 转移至 96 孔板, 在 540nm 处测各管 OD 值。		

实验结果结算：

1. 标准品拟合曲线： $y=ax+b$ 。

2. 按样本质量计算：

$$\text{乙酰胆碱含量(mg/g)}=(\Delta A-b)\div a\times N\div(W\div V)$$

3. 按照液体体积计算：

$$\text{乙酰胆碱含量(mg/mL)}=(\Delta A-b)\div a\times N$$

4. 按细胞数量：

$$\text{乙酰胆碱含}(\mu\text{g}/10^4\text{cell})=(\Delta A-b)\times 10^3\div 500\times N$$

注：

y: 标准管 OD 值-空白管 OD 值
(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

ΔA : 测定管 OD 值-空白管 OD 值
(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

a: 标曲的斜率

W: 样本质量, g

b: 标曲的截距

V: 匀浆加入提取液的体积, mL

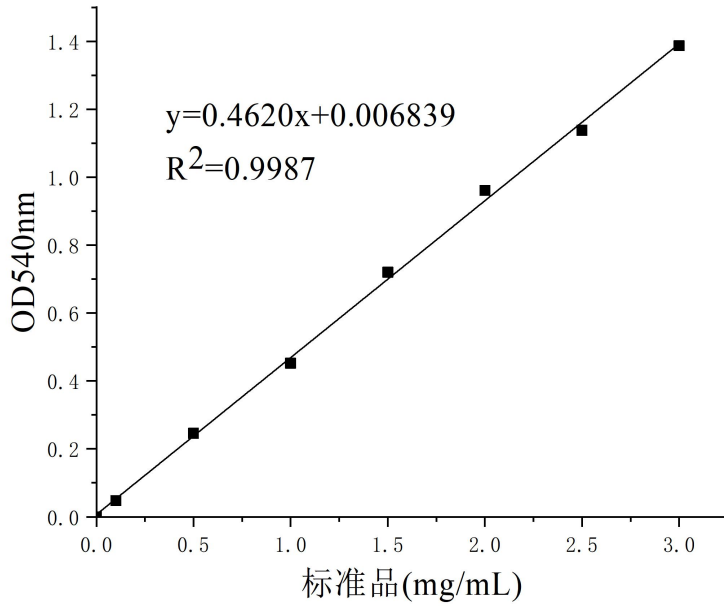
x: 标准品的浓度

N: 样本稀释倍数

500: 细菌或细胞总数, 500 万

参考曲线:

$y=0.4620x+0.006839, R^2=0.9987$, x 是标准品的浓度 (mg/mL), y 是 ΔA 。



注意: 本图仅供参考, 应以每次实验数据所绘制标准曲线计算样本含量。