CheKine™ 乙酰胆碱（Ach）含量检测试剂盒（微量法）

货号: KTB1711　　规格: 48 T/24 S　96 T/48 S　　批号：见产品标签

≠	**检测范围：**20-3750 μg/mL		**灵敏度：**20 μg/mL
	适用样本：血清和全血样本		
	保质期：-20℃，避光保存 6 个月		

01 背景与原理

乙酰胆碱（Acetylcholine，Ach）是一种在生物体内广泛存在的神经递质，它在神经系统中起着至关重要的作用。

本试剂盒检测原理是乙酰胆碱（Ach）在碱性条件下与羟胺（底物）反应生成乙酰异羟肟酸，随后在酸性条件下与铁离子（Fe^{3+}）络合，生成红棕色（或紫红色）的异羟肟酸铁络合物。该络合物的颜色深浅与样品中 Ach 浓度成正比。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Reagent Ⅰ	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20℃，避光保存
Reagent Ⅱ	7 mL	14 mL	4℃，避光保存
Reagent Ⅲ	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃，避光保存
Reagent Ⅳ	3 mL	6 mL	4℃
Reagent Ⅴ	3 mL	6 mL	4℃
Reagent Ⅵ	3 mL	6 mL	4℃，避光保存
Reagent Ⅶ	1.5 mL	1.5 mL	4℃
Standard	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃，避光保存

***请在实验前检查各组分的量。**

***各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。**

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 540 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	去离子水	检测试剂/体系配制用
其他	低温离心机、制冰机、涡旋震荡仪、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- **正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。**
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，**请在实验全程做好生物安全防护**，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Working Reagent Ⅰ	临用前配制；对于 48 T 试剂盒，加入 1.75 mL 去离子水充分溶解粉剂；对于 96 T 试剂盒，加入 3.5 mL 去离子水，充分溶解粉剂	未用完的试剂-20℃避光分装可保存 2 周，避免反复冻融；**Working Reagent Ⅰ有一定毒性，建议在通风橱进行实验**
Reagent Ⅱ	即用型；使用前平衡到室温	4℃避光保存；**Reagent Ⅱ有一定毒性，建议在通风橱进行实验**
Working Reagent Ⅲ	临用前配制；对于 48 T 试剂盒，加入 3 mL 去离子水充分溶解粉剂；对于 96 T 试剂盒，加入 6 mL 去离子水，充分溶解粉剂	未用完的试剂 4℃避光可保存 1 个月；**Working Reagent Ⅲ有一定毒性，建议在通风橱进行实验**
Working Reagent Ⅳ	临用前配制；按照 Working Reagent Ⅲ：Reagent Ⅳ=1:1 充分混匀，根据实验用量按需配制	现配现用
Reagent Ⅴ	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Reagent Ⅵ	即用型；使用前平衡到室温	4℃避光保存
Reagent Ⅶ	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
5 mg/mL Standard	临用前配制；加入 1 mL Reagent Ⅶ充分溶解，配制成 5 mg/mL 乙酰胆碱储备液	-20℃避光分装可保存 1 个月，避免反复冻融；**5 mg/mL Standard 有一定毒性，建议在通风橱进行实验**
500 μg/mL Standard	临用前配制；取 20 μL 5 mg/mL 乙酰胆碱储备液，加入 180 μL 去离子水充分混匀	限当天使用；**500 μg/mL Standard 有一定毒性，建议在通风橱进行实验**

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本。样本尽量新鲜提取，如果不能当天提取，则把分装的血清和全血样本保存在-80℃，一个月内使用。当准备好进行该项实验时，将样本从-80℃拿出后，冰上解冻。但是请注意，这可能会影响样本的稳定性，实验结果可能会低于预期。

- **全血样本**：取 200 μL 肝素抗凝新鲜全血，加入 350 μL 去离子水混合使溶血，加 50 μL Working Reagent Ⅰ，缓慢加入 200 μL Reagent Ⅱ，充分混匀，3500 g，4℃离心 10 min，取上清液，置冰上待测。
- **血清样本**：取 200 μL 血清，加 50 μL Working Reagent Ⅰ，缓慢加入 200 μL Reagent Ⅱ，充分混匀，3500 g，4℃离心 10 min，取上清液，置冰上待测。

05-3 实验步骤

1. **酶标仪准备**：预热 30 min 以上，调节波长到 540 nm。

2. **检测体系配制**：空白管和标准管只需做 1 次，每个测定管均需设置一个对照管。在 1.5 mL 离心管中按照如下方式**依次**操作（请勿修改加样顺序）：

试剂	测定管（μL）	对照管（μL）	空白管（μL）	标准管（μL）
500 μg/mL Standard	0	0	0	8
去离子水	0	0	60	52
Reagent Ⅱ	0	0	20	20
样本上清	80	80	0	0
Working Reagent Ⅳ	80	0	80	80
混匀，室温（25℃）静置 15 min				
Reagent Ⅴ	40	0	40	40
Reagent Ⅵ	40	40	40	40
Reagent Ⅴ	0	40	0	0
Working Reagent Ⅳ	0	80	0	0

3. **吸光度检测**：于涡旋振荡仪混匀 1 min，取 200 μL 上层液转移至 96 孔板，测定 540 nm 处吸光值，分别记为 $A_{测定}$、$A_{对照}$、$A_{空白}$和 $A_{标准}$。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧**二维码**或访问官网[https://www.abbkine.cn] > 进入“**技术中心**”> 查找“**在线计算器**”**工具**。

06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算$\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{对照}$，$\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白}$

2. 样本乙酰胆碱含量计算

- 按全血体积计算

Ach (μg/mL)=ΔA $_{测定}$÷ΔA $_{标准}$×C $_{标准}$×4×n**=ΔA $_{测定}$÷ΔA $_{标准}$×200×n**

- 按血清体积计算

Ach (μg/mL)=ΔA $_{测定}$÷ΔA $_{标准}$×C $_{标准}$×2.25×n**=ΔA $_{测定}$÷ΔA $_{标准}$×112.5×n**

C $_{标准}$：标准品终浓度（基于样本加入量体积的稀释倍数），50 μg/mL；4：对全血初始稀释倍数；2.25：对血清初始稀释倍数；n：稀释倍数。

07 结果展示

示例-1：取小鼠血清，按照测定步骤操作，用 96 孔板进行检测。测得ΔA $_{测定}$=A $_{测定}$-A $_{对照}$=0.115-0.058=0.057，ΔA $_{标准}$=A $_{标准}$-A $_{空白}$=0.124-0.052=0.072。按血清体积计算得：Ach (μg/mL)=ΔA $_{测定}$÷ΔA $_{标准}$×112.5×n=89.062 μg/mL。

08 FAQ

- **检测得到的样本ΔA $_{测定}$过高或者过低怎么办?**

如果ΔA $_{测定}$小于 0.02 可适当加大样本量。如果ΔA $_{测定}$大于 0.4，样本可用去离子水进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数，或减少提取用样本量，再重新进行测定。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1200	CheKine™ 蛋白质羰基含量检测试剂盒（微量法）
KTB1551	CheKine™ 非蛋白质巯基含量检测试剂盒（微量法）

CheKine™ 乙酰胆碱（Ach）含量检测流程示意图

（Abbkine 货号：KTB1711）

样本处理



取200 μL肝素抗凝新鲜全血，加入350 μL去离子水混合使溶血，加50 μL Working Reagent Ⅰ，缓慢加入200 μL Reagent Ⅱ



取200 μL血清，加50 μL Working Reagent Ⅰ，缓慢加入200 μL Reagent Ⅱ



充分混匀，3500 g，4℃离心10 min



体系配置



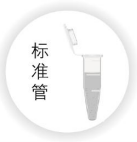
样本上清 80 μL
Working Reagent IV 80 μL



样本上清 80 μL



去离子水 60 μL
Reagent Ⅱ 20 μL
Working Reagent IV 80 μL



500 μg/mL Standard 8 μL
去离子水 52 μL
Reagent Ⅱ 20 μL
Working Reagent IV 80 μL

混匀，室温（25℃）静置15 min

Reagent Ⅴ 40 μL
Reagent Ⅵ 40 μL

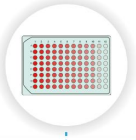
Reagent Ⅵ 40 μL
Reagent Ⅴ 40 μL
Working Reagent IV 80 μL

Reagent Ⅴ 40 μL
Reagent Ⅵ 40 μL

Reagent Ⅴ 40 μL
Reagent Ⅵ 40 μL

于涡旋振荡仪混匀1 min，取200 μL上层液转移至96孔板

数据检测



测定540 nm吸光度
结果计算