

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-F055

产品规格: 96T(40 samples)

检测仪器: 荧光酶标仪(激发波长 535 nm, 发射波长 587 nm)

Elabscience®胆碱/乙酰胆碱荧光法测试盒

Choline/Acetylcholine Fluorometric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清(浆)和动物组织样本中的胆碱/乙酰胆碱的含量。

检测原理

胆碱和乙酰胆碱在许多生物过程中起着重要作用。胆碱是一种必要的营养物质,通常与B族复合维生素归为一类,在许多生物过程中起着关键作用。胆碱是合成乙酰胆碱(AchE)的前体,乙酰胆碱是外周和中枢神经系统的一种重要神经递质。

本试剂盒中胆碱是通过酶偶联反应测定,生成荧光产物,荧光物质的含量与存在的胆碱成正比。在反应中加入乙酰胆碱酯酶,将乙酰胆碱水解为胆碱和乙酸,通过测定胆碱和乙酰胆碱总量,进一步计算出乙酰胆碱含量。

本试剂盒检测组织样本时,需测定总蛋白浓度,推荐使用BCA法。(货号:E-BC-K318-M)。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	20 mL×1 瓶	-20 ℃ 保存 3 个月
试剂二 (Reagent 2)	水解酶 (Hydrolase)	1.3 mL×2 支	-20 ℃ 避光 保存 3 个月
试剂三 (Reagent 3)	复合酶 (Complex Enzyme)	0.4 mL×1 支	-20 ℃ 避光 保存 3 个月
试剂四 (Reagent 4)	1 mmol/L 标准品溶液 (1 mmol/L Standard Solution)	0.1 mL×1 支	-20 ℃ 避光 保存 3 个月
试剂五 (Reagent 5)	显色剂 (Chromogenic Agent)	0.1 mL×1 支	-20 ℃ 避光 保存 3 个月
	96 孔黑色酶标板	1 板	
	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明:试剂严格按上表中的保存条件保存,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;本

试剂盒仅测胆碱含量时，一个试剂盒可以测定 40 个样本；当测定乙酰胆碱的含量时，一个试剂盒可以测定 26 个样本。

所需自备物品

仪器：荧光酶标仪(激发波长 535 nm，发射波长 587 nm)，37℃ 恒温箱

试剂：生理盐水(0.9% NaCl)

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温，试剂二和试剂三禁止反复冻融，试剂二与试剂三使用前可进行分装，-20℃保存。

② 反应工作液的配制：

按照试剂三：试剂一=1：40的体积比混匀，按需配制，置于冰上避光待用，现配现用，4 h内使用有效。

③ 试剂五工作液的配制：

按照试剂五：试剂一=1：50的体积比混匀，按需配制，置于冰上避光待用，现配现用，4 h内使用有效。

④ 10 μmol/L标准品溶液的配制：

按照试剂四：试剂一=1：99的体积比混匀，按需配制，未用完2-8℃避光可保存2天。

⑤ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(μmol/L)	0	2	3	4	6	8	9	10
10 μmol/L 标准品(μL)	0	40	60	80	120	160	180	200
试剂一(μL)	200	160	140	120	80	40	20	0

样本准备

① 样本处理

组织样本：按照组织样本质量(g)：生理盐水(0.9% NaCl)体积(mL)=1: 9匀浆，匀浆离心后取上清待测，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

液体样本：血清血浆样本直接测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.06-10 $\mu\text{mol/L}$ ，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%小鼠心组织	10-20	10%小鼠肾组织	15-25
10%大鼠肝组织	10-20	10%小鼠脑组织	15-25
10%小鼠肺组织	10-20	10%小鼠肝组织	10-20
人血清	3-5	大鼠血清	3-7
大鼠血浆	不稀释		

注：稀释液为生理盐水(0.9% NaCl)。

实验关键点

试剂二和试剂三禁止反复冻融。

操作步骤

胆碱含量测定：

- ① 标准孔：取 20 μL 不同浓度的标准品溶液，加入相应的酶标孔中。
胆碱测定孔：取 20 μL 待测样本加入酶标孔中。
对照孔：取 20 μL 待测样本加入酶标孔中。
- ② 向步骤①中标准孔和胆碱测定孔加入 120 μL 反应工作液，对照孔加入 140 μL 试剂一。
- ③ 向步骤②中胆碱测定孔和标准孔加入 20 μL 试剂一。
- ④ 向步骤③中各孔加入 20 μL 试剂五工作液。
- ⑤ 振板 3 s，室温避光静置 5 min，荧光酶标仪激发波长 535 nm，发射波长 587 nm 测定各孔荧光值。

胆碱和乙酰胆碱总量测定：

- ① 标准孔：取 20 μL 不同浓度的标准品溶液，加入相应的酶标孔中。
胆碱测定孔：取 20 μL 待测样本加入酶标孔中。
胆碱和乙酰胆碱总量测定孔：取 20 μL 待测样本加入酶标孔中。
对照孔：取 20 μL 待测样本加入酶标孔中。
- ② 向步骤①中标准孔、胆碱测定孔、胆碱和乙酰胆碱总量测定孔加入 120 μL 反应工作液，对照孔加入 140 μL 试剂一。
- ③ 向步骤②中胆碱测定孔和标准孔加入 20 μL 试剂一，向胆碱和乙酰胆碱总量测定孔加入 20 μL 试剂二。
- ④ 向步骤③中各孔加入 20 μL 试剂五工作液。
- ⑤ 振板 3 s，室温避光静置 5 min，荧光酶标仪激发波长 535 nm，发射波长 587 nm 测定各孔荧光值。

操作表

单独测定胆碱含量：

	标准孔	胆碱测定孔	对照孔
不同浓度的标准品(μL)	20	--	--
待测样本(μL)	--	20	20
反应工作液(μL)	120	120	--
试剂一(μL)	20	20	140
试剂五工作液(μL)	20	20	20
振板 3 s, 室温避光静置 5 min			
荧光酶标仪激发波长 535 nm, 发射波长 587 nm 测定各孔荧光值。			

测定胆碱和乙酰胆碱含量：

	标准孔	胆碱测定孔	胆碱和乙酰胆碱总量测定孔	对照孔
不同浓度的标准品(μL)	20	--	--	--
待测样本(μL)	--	20	20	20
反应工作液(μL)	120	120	120	--
试剂一(μL)	20	20	--	140
试剂二(μL)	--	--	20	--
试剂五工作液(μL)	20	20	20	20
振板 3 s, 室温避光静置 5 min				
荧光酶标仪激发波长 535 nm, 发射波长 587 nm 测定各孔荧光值。				

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法。(货号：**E-BC-K318-M**)。

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

组织样本中胆碱/乙酰胆碱含量计算公式:

$$\begin{aligned} \text{胆碱含量} &= (\Delta F_1 - b) \div a \div C_{pr} \times f \\ (\mu\text{mol/gprot}) & \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{乙酰胆碱含量} &= (\Delta F_2 - b) \div a \div C_{pr} \times f \\ (\mu\text{mol/gprot}) & \end{aligned}$$

血清(浆)样本中胆碱/乙酰胆碱计算公式:

$$\begin{aligned} \text{胆碱含量} &= (\Delta F_1 - b) \div a \times f \\ (\mu\text{mol/L}) & \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{乙酰胆碱含量} &= (\Delta F_2 - b) \div a \times f \\ (\mu\text{mol/L}) & \end{aligned}$$

注解:

y: 标准品荧光值-空白荧光值(标准品浓度为 0 时的荧光值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔF_1 : 胆碱测定绝对荧光值(胆碱测定荧光值 F_1 -对照荧光值 F_0)

ΔF_2 : 乙酰胆碱测定绝对荧光值(胆碱和乙酰胆碱总量测定荧光值 F_2 -胆碱测定荧光值 F_1)

C_{pr} : 组织匀浆蛋白浓度(gprot/L)

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

附录1 关键数据

1. 技术参数

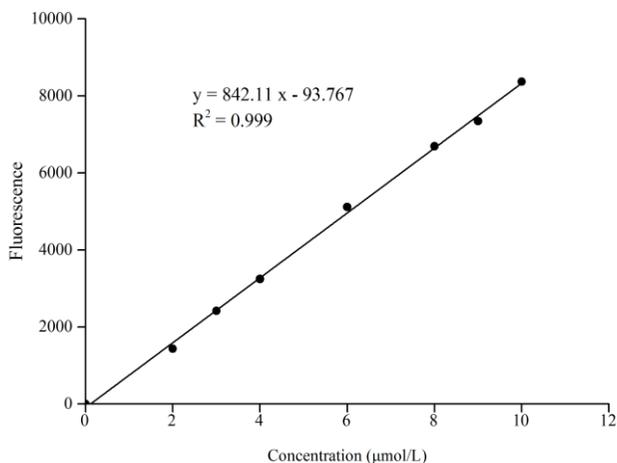
检测范围	0.06-10 $\mu\text{mol/L}$	批间差	8.2-10 %
灵敏度	0.06 $\mu\text{mol/L}$	批内差	3.2-5.0 %
回收率	98-101 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量20 μL ，按照操作步骤进行实验，测定荧光值如下表所示：

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	2	3	4	6	8	9	10
荧光值	1021	2487	3379	4326	6118	7603	8179	9317
	1083	2485	3565	4265	6220	7886	8611	9524
平均荧光值	1052	2486	3472	4296	6169	7745	8395	9421
绝对荧光值	0	1434	2420	3244	5117	6693	7343	8369

② 绘制标曲(如下图)：



附录2 实例分析

例如检测小鼠肝组织(数据仅供参考):

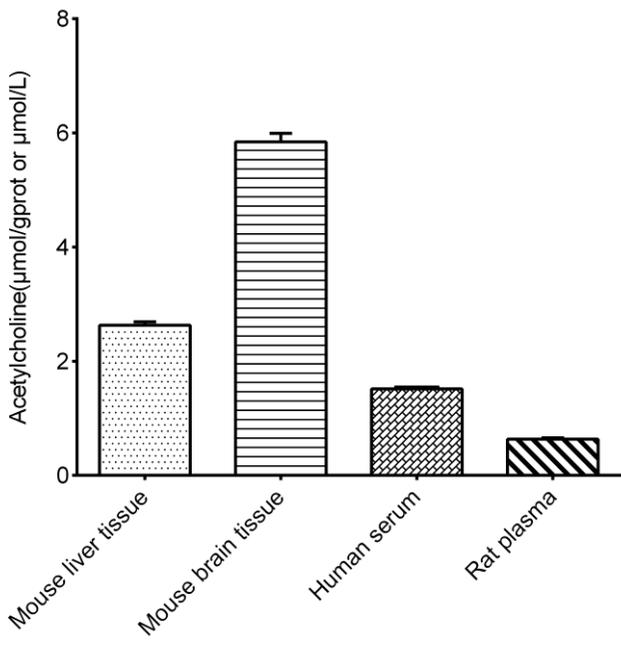
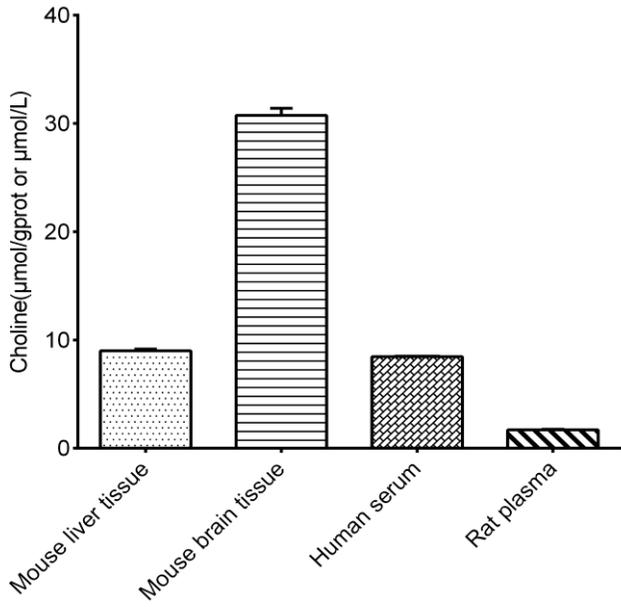
制备的10%匀浆小鼠肝组织上清液用生理盐水(0.9% NaCl)稀释20倍, 取稀释后的样本20 μL , 按操作表操作, 结果如下:

标准曲线: $y = 842.11x - 93.767$, 对照荧光值为358, 胆碱测定孔荧光值为2684, 胆碱和乙酰胆碱总量测定孔荧光值为3282, $\Delta F_1 = 2684 - 358 = 2326$, $\Delta F_2 = 3282 - 2684 = 598$, 10%小鼠肝组织匀浆蛋白浓度为6.33 gprot/L计算结果为:

$$\text{胆碱含量} = (2326 + 93.767) \div 842.11 \div 6.33 \times 20 = 9.07 \mu\text{mol/gprot}$$

$$\text{乙酰胆碱含量} = (598 + 93.767) \div 842.11 \div 6.33 \times 20 = 2.60 \mu\text{mol/gprot}$$

按说明书操作, 测定小鼠肝组织(10%组织匀浆蛋白浓度为6.33 gprot/L, 稀释20倍, 加样量20 μL)、小鼠脑组织(10%组织匀浆蛋白浓度为5.59 gprot/L, 稀释20倍, 加样量20 μL)、人血清(不稀释, 加样量20 μL)、大鼠血浆(不稀释, 加样量为20 μL)中的胆碱和乙酰胆碱的含量(如下图):



声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。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。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

