

乙醇 (ethanol) 含量测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-FM030 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

乙醇在自然界中无处不在, 如食品, 果实, 酒类, 药品, 化妆品等; 本试剂盒利用乙醇脱氢酶使乙醇转化为乙醛, 同时伴随 NADH 生成; 由于乙醇脱氢酶利于乙醇的生成而不是分解, 本试剂盒额外添加特异试剂使乙醇脱氢酶能够彻底分解乙醇, 进一步通过检测 NADH 在 340nm 的上升量计算出样本中乙醇含量。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 1 支	-20℃ 保存	1. 临用前 8000g 4℃ 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解, 可 -20℃ 分装保存, 禁止反复冻融。
试剂二	粉剂 1 支	4℃ 保存	1. 临用前 8000g 4℃ 离心 2min 使粉剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	液体 1 支	-20℃ 保存	1. 临用前 8000g 4℃ 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 加入 0.6mL 蒸馏水混匀备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

- ① 称取约 0.2g 组织 (水分充足的样本可取约 0.5g), 加入 1mL 蒸馏水, 进行冰浴匀浆, 12000rpm, 室温离心 10min, 取上清液待测。(若组织样本蛋白含量很高, 可进行脱蛋白处理)

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 5~10: 1 的比例进行提取

- ② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌或细胞加入 1mL 蒸馏水, 在 4℃ 或冰浴进行匀浆 (或使用各类常见电动匀浆器)。4℃ 约 12,000rpm 离心 10min, 取上清作为待测样品。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10⁴): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

- ③ 液体样品: 澄清的液体样本直接检测, 若浑浊则离心后取上清液检测。

2、检测步骤:

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃）或水浴锅（25℃）孵育 15-20min。
- ③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管
样本	10
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	165
混匀，室温（25℃）孵育 10min，于 340nm 处读取 A1 值，	
试剂四	5
混匀，室温（25℃）反应 30min，于 340nm 处读取 A2 值， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】若 ΔA 的值在零附近徘徊，可以增加样本量 $V1$ （相应的试剂三减少）或样本制备的时候，增加样本质量 W ，则改变后的 $V1$ 或 W 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

- 1、按照样品质量计算：

$$\text{乙醇含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^6] \div (W \times V1 \div V) \div 2 = 148.14 \times \Delta A \div W$$

- 2、按细胞数量计算：

$$\text{乙醇含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^6] \div (500 \times V1 \div V) \div 2 = 148.14 \times \Delta A \div 500$$

- 3、按照液体体积计算：

$$\text{乙醇含量}(\mu\text{g/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^6] \div V1 \div 2 = 148.14 \times \Delta A$$

- 4、按照蛋白浓度计算：

$$\text{乙醇含量}(\mu\text{g}/\text{mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^6] \div (Cpr \times V1 \div V) \div 2 = 148.14 \times \Delta A \div Cpr$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； d ---96 孔板光径，0.5cm；

V ---加入提取液体积，1 mL；

$V1$ ---加入反应体系中样本体积，0.01mL；

$V2$ ---反应总体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

Mr ---乙醇分子量，46.07；

W ---样本质量，g；

2---1 分子乙醇产生 2 分子 NADH；

500---细胞数量，万；

Cpr ---蛋白浓度 (mg/mL)；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。