乙酸（Acetic acid）含量测定试剂盒说明书

（货号：ADS-W-S020-24　微板法 24 样　有效期：3 个月）

一、指标介绍：

乙酸在自然界中分布广泛，例如以乙酸乙酯的形式存在于果蔬和植物油中，以游离酸的形式存在于动物组织、排泄物以及血液中，亦可在微生物体内由其他有机物发酵转化而来。

本试剂盒提供一种快速、灵敏的检测方法：乙酸在 ATP 存在的情况下，经过磷酸转乙酰酶和乙酸激酶的相继作用，转变为乙酰辅酶 A 和 ADP，再通过丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶催化 NADH 氧化生成 NAD+，检测 340nm 下 NADH 的消耗量，进而计算乙酸的含量结果。

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
提取液	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	试剂×1 支	4℃保存	1. 临用前加入 0.6mL 蒸馏水溶解待用； 2. 溶解后的试剂分装-20℃冻存（延长保存时效，避免反复冻融）。
试剂二	试剂×1 支	4℃保存	1. 临用前加入 0.6mL 蒸馏水溶解待用； 2. 溶解后的试剂分装-20℃冻存（延长保存时效，避免反复冻融）。
试剂三	试剂×1 支	4℃保存	1. 临用前加入 0.3mL 蒸馏水溶解待用； 2. 溶解后的试剂分装-20℃冻存（延长保存时效，避免反复冻融）。
试剂四	试剂×1 支	4℃保存	1. 临用前加入 0.3mL 蒸馏水溶解待用； 2. 溶解后的试剂分装-20℃冻存（延长保存时效，避免反复冻融）。
试剂五	试剂×1 支	4℃保存	1. 临用前加入 0.3mL 蒸馏水溶解待用； 2. 溶解后的试剂分装-20℃冻存（延长保存时效，避免反复冻融）。
试剂六	试剂×1 支	-20℃保存	1. 临用前加入 0.3mL 蒸馏水溶解待用； 2. 溶解后的试剂分装-20℃冻存（延长保存时效，避免反复冻融）。
试剂七	试剂×1 支	-20℃保存	1. 临用前加入 0.3mL 蒸馏水溶解待用； 2. 溶解后的试剂分装-20℃冻存（延长保存时效，避免反复冻融）。

【注】：粉剂量在 mg 级别，使用前用手甩几次或者进行离心，打开直接加入要求的试剂即可。

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 组织、食品类样本：称取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.5g，较轻的干样可取 0.05g），加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm，25℃（室温）离心 10min，取上清待测。

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

2.若样本中含有影响实验反应的酶类（主要为生物样本），可在匀浆后 80℃孵育 25min，待恢复室温离心取上清液进行后续实验。

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 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）；12000rpm，25℃（室温）离心 10min，取上清待测。

【注】：1.若增加样本量，可按照细菌或细胞数量（10^4个）：提取液体积（mL）为 1000~5000：1 的比例进行提取。

2.若样本中含有影响实验反应的酶类（主要为生物样本），可在匀浆后 80℃孵育 25min，待恢复室温离心取上清液进行后续实验。

3. 本实验亦可用裂解液裂解细胞样本进行后续实验检测，裂解方式以裂解液操作说明为准。

③ 液体样本：

（1）偏中性的样本直接检测。若浑浊，12000rpm，4℃离心 10min，离心后取上清检测。

(2) 高蛋白的液体样本：混匀，吸取 0.1mL 以上至离心管中，80℃孵育 25min，待恢复室温，12000rpm，25℃（室温）离心 10min，取上清待测。

（3）酸性液体样本(PH≤5)：先用 2mol/L 氢氧化钾水溶液调节 PH 至 7.5，混匀，室温静置 30min，12000rpm，25℃（室温）离心 10min，取上清待测。

2、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min（仪器过自检程序亦可），调节波长至 340nm。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）。

③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管
样本	20
提取液	90
试剂一	20
试剂二	20
试剂三	10
试剂四	10
试剂五	10
试剂六	10
混匀，室温(25℃)孵育 5min 后于 340nm 处读取 A1 值	
试剂七	10
混匀，室温(25℃)孵育 10min 后于 340nm 处读取 A2,△A=A1-A2。	

【注】：1. 若ΔA 小于 0.01，可以增加样本量 V1（如增至 40μL，则提取液相应减少），或增加样本取样质量 W；则调整后加样体积 V1 和 W 需代入计算公式重新计算。

2. 若ΔA 数值较大，且反应 10min 后仍然数值明显下降（每分钟吸光度下降大于 0.02），则需延长反应时间，或稀释样本检测。

五、结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算：

乙酸含量(μg/mg prot) $[\triangle A\div(\varepsilon\times d)\times V2\times 10^6\times Mr]\div(Cpr\times V1\div V)\times D=193.09\times\triangle A\div Cpr\times D$

2、按样本鲜重计算：

乙酸含量(μg/g 鲜重)=[△A÷(ε×d)×V2×10^6×Mr]÷(W×V1÷V)×D=193.09×△A×D÷W

3、按细菌/细胞密度计算：

乙酸含量(μg/10^4cell)=[△A÷(ε×d)×V2×10^6×Mr]÷(500×V1÷V)×D=193.09×△A÷500×D

4、按液体体积计算：

乙酸含量(μg/mL)=[△A÷(ε×d)×V2×10^6×Mr]÷V1×D=193.09×△A×D

V：加入提取液体积，1 mL；

V1：加入样本体积，0.02mL；

V2----反应总体积；0.2mL=2×10^{-4}L；

W：样本质量，g；

d---96 孔板光径，0.5cm；

D---稀释倍数，按说明书操作稀释倍数为 1；

ε---NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3L/mol/cm；

500：细胞或细菌总数；500 万；

Mr---乙酸分子量；60.05

Cpr：蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。