

## 乙醇 (Ethanol) 含量测定试剂盒说明书

(微板法 48 样)

## 一、产品简介:

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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部,再加 0.6mL 蒸馏水溶解,可-20℃分装保存,禁止反复冻容;
试剂二	粉剂 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部,再加 0.6mL 蒸馏水溶解备用;
试剂三	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 μL×1 支	-20℃保存	临用前甩几下使液体落入底部,再加 0.3mL 蒸馏水混匀备用。

## 三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰、蒸馏水。

## 四、乙醇 (ethanol) 含量测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

## 1、样本制备:

- ① 称取约 0.2g 组织(水分含量高的样本可取约 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 提取液,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( $10^4$ ):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、上机检测:

- 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:

试剂名称 (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 $\Delta A$  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：

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

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

$V$ ---加入提取液体积， $1 \text{ mL}$ ；

$V1$ ---加入反应体系中样本体积， $0.01\text{mL}$ ；

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

$Mr$ ---乙醇分子量， $46.07$ ；

$W$ ---样本质量， $\text{g}$ ；

2---1 分子乙醇产生 2 分子 NADH。

500---细胞数量，万。