

## 乙醇 (ethanol) 含量测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-FM030 微板法 96 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	液体 1 支	-20℃ 保存	临用前甩几下使液体落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水溶解, 可-20℃ 分装保存, 禁止反复冻容;
试剂二	粉剂 1 支	4℃ 保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用;
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	液体 1 支	-20℃ 保存	临用前甩几下使液体落入底部, 再加 0.6mL 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 (10<sup>4</sup>): 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， $\Delta A=A_2-A_1$ 。

【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：

$$\text{乙醇含量}(\mu\text{g/g 鲜重})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times Mr \times 10^6] \div (W \times V_1 \div V) \div 2 = 148.14 \times \Delta A \div W$$

### 2、按细胞数量计算：

$$\text{乙醇含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times Mr \times 10^6] \div (500 \times V_1 \div V) \div 2 = 148.14 \times \Delta A \div 500$$

### 3、按照液体体积计算：

$$\text{乙醇含量}(\mu\text{g/mL})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times Mr \times 10^6] \div V_1 \div 2 = 148.14 \times \Delta A$$

$\epsilon$ ---NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  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， $2 \times 10^{-4}$  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。