

## 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<sup>+</sup>, 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  | 粉体 mg×1 支   | 4℃ 保存   | 1. 临用前加入 0.6mL 蒸馏水溶解待用;<br>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  | 粉体 mg×1 支   | 4℃ 保存   | 1. 临用前加入 0.6mL 蒸馏水溶解待用;<br>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  | 粉体 mg×1 支   | 4℃ 保存   | 1. 临用前加入 0.3mL 蒸馏水溶解待用;<br>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  | 粉体 mg×1 支   | 4℃ 保存   | 1. 临用前加入 0.3mL 蒸馏水溶解待用;<br>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  | 粉体 mg×1 支   | 4℃ 保存   | 1. 临用前加入 0.3mL 蒸馏水溶解待用;<br>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  | 粉体 mg×1 支   | -20℃ 保存 | 1. 临用前加入 0.3mL 蒸馏水溶解待用;<br>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  | 粉体 mg×1 支   | -20℃ 保存 | 1. 临用前加入 0.3mL 蒸馏水溶解待用;<br>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 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, $\Delta A = A1 - A2$ 。 |     |

【注】：1. 若  $\Delta A$  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  $\Delta A$  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)  $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr] \div (Cpr \times V1 \div V) \times D = 193.09 \times \Delta A \div Cpr \times D$

### 2、按样本鲜重计算：

乙酸含量(μg/g 鲜重)  $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr] \div (W \times V1 \div V) \times D = 193.09 \times \Delta A \times D \div W$

3、按细菌/细胞密度计算：

乙酸含量( $\mu\text{g}/10^4\text{cell}$ )= $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^6 \times \text{Mr}] \div (500 \times V_1 \div V) \times D = 193.09 \times \Delta A \div 500 \times D$

4、按液体体积计算：

乙酸含量( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )= $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^6 \times \text{Mr}] \div V_1 \times D = 193.09 \times \Delta A \times D$

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= $2 \times 10^{-4}\text{L}$ ；

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；

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

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。