

乙酸 (Acetic acid) 含量测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-S020 微板法 48 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 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉体 mg×1 支	4℃ 保存	1. 临用前加入 1.2mL 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	粉体 mg×1 支	4℃ 保存	1. 临用前加入 1.2mL 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	粉体 mg×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)。
试剂四	粉体 mg×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)。
试剂五	粉体 mg×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)。
试剂六	粉体 mg×1 支	-20℃ 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)。
试剂七	粉体 mg×1 支	-20℃ 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)。

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

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($\mu\text{g}/10^4\text{cell}$)= $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr] \div (500 \times V1 \div V) \times D = 193.09 \times \Delta A \div 500 \times D$

4、按液体体积计算:

乙酸含量($\mu\text{g}/\text{mL}$)= $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr] \div V1 \times D = 193.09 \times \Delta A \times D$

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;

ϵ ---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。