

## 乙醇含量检测试剂盒（微量法）

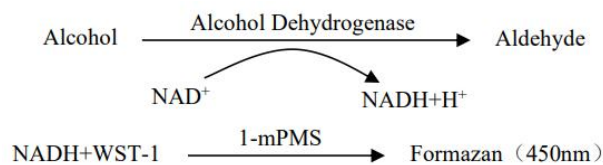
产品货号：BA2259

产品规格：100T/96S

### 产品说明：

酒是含酒精（乙醇）饮料的统称，乙醇是酒的主要成分，是衡量酒质量的重要指标之一。乙醇可用于制造醋酸、饮料、香精、染料、燃料等，医疗上常用体积分数为70%~75%的乙醇作消毒剂。乙醇在化学工业、医疗卫生、食品工业、农业生产等领域都有广泛的用途。

乙醇脱氢酶催化乙醇脱氢生成乙醛，同时还原NAD<sup>+</sup>生成NADH和H<sup>+</sup>，在1-mPMS作用下，WST-1可与NADH反应，产生水溶性formazan，其在450nm处有最大吸收峰，据此可计算乙醇含量。



**注意：**实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

### 产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体110mL×1瓶	2-8℃
提取液二	液体20mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体12mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×1支	-20℃
试剂三	粉剂×1支	-20℃
试剂四	液体4mL×1瓶	2-8℃
试剂五	液体0.4mL×1支	-20℃
标准品	液体0.4mL×1支	2-8℃

### 溶液的配制：

1. 试剂二：临用前加入1.2mL蒸馏水溶解，用不完的试剂可-20℃分装保存4周，避免反复冻融。
2. 试剂三：临用前加入1.5mL蒸馏水溶解，用不完的试剂可-20℃分装保存4周，避免反复冻融。
3. 试剂五工作液：临用前根据样本量按照试剂五：蒸馏水=1 μL：99 μL（共1mL，约10T）的比例配制，现用现配。
4. 1.25 μmol/mL标准溶液：临用前取58.4 μL标准品加入941.6 μL蒸馏水配成1000 μmol/mL的标准溶液；再取25 μL 1000 μmol/mL的标准溶液加入975 μL蒸馏水配成25 μmol/mL的标准溶液；再取50 μL 25 μmol/mL的标准溶液加入950 μL蒸馏水配成1.25 μmol/mL的标准溶液用于下述标准管的测定。

### 自备材料：

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、恒温培养箱/水浴锅、研钵/匀浆器/超声波细胞破碎仪、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、冰和蒸馏水。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

### 测定步骤:

#### 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 组织：按照质量（g）：提取液一体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g，加入1mL提取液一）加入提取液一，冰浴匀浆后于4℃ 12000g离心10min，取0.8mL上清液，再缓慢加入0.15mL提取液二，缓慢吹打混匀至无气泡产生，4℃ 12000g离心10min后取上清待测。
2. 细胞/细菌：按照细胞/细菌数量（10<sup>4</sup>个）：提取液一体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细胞/细菌 加入1mL提取液一），冰浴超声波破碎细胞/细菌（功率200W，超声3秒，间隔7秒，总时间5min）；于4℃ 12000g 离心10min，取0.8mL上清液，再缓慢加入0.15mL提取液二，缓慢吹打混匀至无气泡产生，4℃ 12000g离心10min 后取上清待测。
3. 血清（浆）：取100μL血清（浆）样本加入1mL提取液一，混匀后4℃ 12000g离心10min，取0.8mL上清液，再 缓慢加入0.15mL提取液二，缓慢吹打混匀至无气泡产生，4℃ 12000g离心10min后取上清待测。
4. 其他液体：直接测定。若有浑浊请离心后取上清待测。

**注：提取液二需缓慢加入，加入后会产生大量气泡，建议使用2mL EP管进行操作。**

#### 二、测定步骤

1. 分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至450nm，分光光度计蒸馏水调零。
2. 临用前将试剂一37℃预热10min以上。
3. 操作表：（在微量玻璃比色皿/96孔板中加入下列试剂）

试剂名称（μL）	测定管	标准管	空白管
样本	40	-	-
标准品	-	40	-
蒸馏水	-	-	40
试剂一	100	100	100
试剂二	10	10	10
试剂三	10	10	10
试剂四	30	30	30
试剂五工作液	10	10	10

充分混合后，于450nm处测定15s时的吸光值A1，迅速置于37℃水浴锅或恒温培养箱反应10min（酶标仪有控温功能可将温度调至37℃），测定10min15s的吸光值A2，分别记为A1测定、A1标准、A1空白和A2测定、A2标准、A2空白，计算  $\Delta A_{测定} = (A2_{测定} - A1_{测定}) - (A2_{空白} - A1_{空白})$ ， $\Delta A_{标准} = (A2_{标准} - A1_{标准}) - (A2_{空白} - A1_{空白})$ 。空白管和标准管只需做1-2次。注：若样本数量过多，可将试剂一、二、三、四按比例配制成工作液使用，试剂五工作液需最后加入。

#### 三、乙醇含量计算

##### 1. 按样本质量计算

乙醇含量（μmol/g 质量）

$$= \Delta A_{测定} \times C_{标准} \div \Delta A_{标准} \times (V_{上清} + V_{提取液二}) \div (W \times V_{上清} \div V_{提取液一}) \times F$$

$$= 1.484 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div W \times F$$

##### 2. 按照样本蛋白浓度计算

苹果酸含量（μmol/mg prot）=  $\Delta A_{测定} \times C_{标准} \div \Delta A_{标准} \times V_{样本} \div (V_{样本} \times C_{pr}) \times F$

$$= 1.25 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div C_{pr} \times F$$

##### 3. 按照细胞/细菌数量计算

乙醇含量（μmol/10<sup>4</sup> cell）=  $\Delta A_{测定} \times C_{标准} \div \Delta A_{标准} \times (V_{上清} + V_{提取液二}) \div (N \times V_{上清} \div V_{提取液一}) \times F$

$$= 1.484 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div N \times F$$



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

#### 4. 按血清（浆）体积计算

乙醇含量（ $\mu\text{mol/mL}$ ）

$$= \Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div [V_{\text{液体}} \times V_{\text{上清}} \div (V_{\text{提取液一}} + V_{\text{液体}})] \times F$$
$$= 16.328 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F$$

#### 5. 按其他液体体积计算

乙醇含量（ $\mu\text{mol/mL}$ ）=  $\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{样本}} \times F$

$$= 1.25 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F$$

C标准：标准溶液浓度， $1.25\mu\text{mol/mL}$ ；V上清：提取时上清液体积， $0.8\text{mL}$ ；V提取液二：加入提取液二的体积， $0.15\text{mL}$ ；V提取液一：加入的提取液一体积， $1\text{mL}$ ；W：样本质量，g；N：细胞/细菌数量，以 $10^4$ 计；V液体：提取时血清（浆）样本体积， $0.1\text{mL}$ ；V样本：反应体系中加入的样本体积， $0.04\text{mL}$ ；F：样本稀释倍数。

#### 注意事项：

1. 保证实验结果的准确性和稳定性，请严格控制反应时间和操作时间。不建议一次测定过多样本，以免影响酶促反应时间的一致性。
2. 如果测定管吸光值  $\Delta A_{\text{测定}}$  大于0.8或者 $A_{1\text{测定}}$  大于1.5，建议用蒸馏水稀释样本后再测定，注意同步修改计算公式。
3. 如果测定管吸光值  $\Delta A_{\text{测定}}$  小于0.01，建议增加样本量或者在样本处理步骤中增大样本比例后再进行测定。如果增加样本量，空白管和标准管也需相应调整。
4. 提取液中含有蛋白沉淀剂，若需要按照蛋白浓度计算，则需要重新提取测定蛋白浓度。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com