Amplex Red乙醇检测试剂盒

产品货号：27071

产品规格：100次

产品简介：

乐业研发的Amplex Red乙醇检测试剂盒(Amplex Red Ethanol Assay Kit)是一种基于探针Amplex Red，利用荧光或吸光度检测，快速、高灵敏地对血清、血浆、尿液等生物体液、组织、细胞以及组织或细胞培养上清以及饮料等样品中乙醇含量进行检测的试剂盒。

乙醇(Ethanol, Alcohol或Ethyl Alcohol)，俗称酒精，化学式为CH_3CH_2OH (C_2H_6O或C_2H_5OH)或EtOH，是带有一个羟基的饱和一元醇，在常温、常压下是一种易燃、易挥发的无色透明液体。乙醇是很多饮品中含有的神经活性成分，能够发挥中枢神经系统镇静剂的作用，是一种强大的精神药物和几乎最古老的消遣性饮品。乙醇在摄入后会通过胃和小肠吸收，从而进入血液。乙醇主要通过肝脏完成代谢，也会通过尿液或呼吸被排出。乙醇代谢的速率主要取决于体内酶的含量，具有较大的个体差异，并与遗传有关。少量饮酒可以促进血液循环，但大量的乙醇摄入则会导致多种不同的疾病。当血液中乙醇浓度达到0.1%时，大脑皮层就受到抑制，皮层下的低级中枢则因抑制降低而兴奋，使人产生明显的醉酒感觉；乙醇浓度达到0.2%时，会使人行为失常；达到0.4%时，人就会失去知觉，昏迷不醒，甚至有生命危险，达到0.5%或者更高浓度通常都是致命的。因此，定量检测乙醇的含量在基础研究、药物开发、临床研究和发酵工业等领域都有着重要的意义。

本试剂盒中的Amplex Red是一种对H_2O_2高度敏感的荧光探针。在辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP)存在的情况下，Amplex Red能与$H_2O_2$1:1反应，产生强烈的红色荧光物质试卤灵(Resorufin)。试卤灵的最大激发波长为571nm，最大发射波长为585nm，并且在激发波长处有很强的可见光吸收。因此本试剂盒可以用吸光度和荧光两种方法来进行检测。

本试剂盒的检测原理请参考图1。乙醇(Ethanol)在乙醇氧化酶(Alcohol oxidase, ALOD or AOX)的作用下和氧气发生氧化反应生成乙醛(Acetaldehyde)和H_2O_2，再通过检测H_2O_2与Amplex Red的反应产物试卤灵的荧光强度或吸光度来最终计算样品中乙醇的含量。试卤灵的荧光强度或吸光度与样品中乙醇的含量成正比。

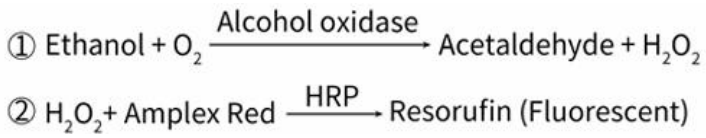

图1. 乐业Amplex Red乙醇检测试剂盒检测原理图。

本试剂盒检测灵敏度高，线性范围宽，样品用量少。本试剂盒在样品体积为50μl时，采用吸光度检测可以检测浓度低至0.001%的乙醇，在0.001-0.02% (0.17-3.43mM)浓度范围内有良好的线性关系；采用荧光检测可以检测浓度低至0.0001%的乙醇，在0.0001-0.005% (17.16-857.5μM)浓度范围内有良好的线性关系。荧光检测的灵敏度比吸光度检测高约10倍，可以使用更少量的样品。本试剂盒提供了乙醇标准溶液，可以通过绘制标准曲线(图2)，计算出样品中的乙醇含量。

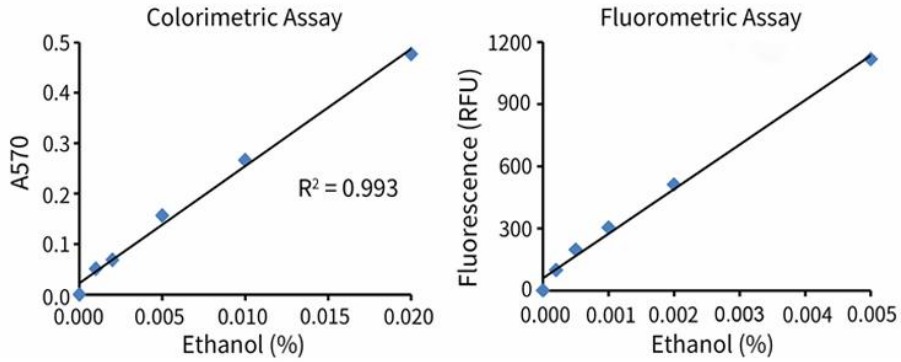

图2. 乐业Amplex Red乙醇检测试剂盒检测乙醇标准品的标准曲线。左图为吸光度检测，右图为荧光检测。本试剂盒采用吸光度检测时，在0.001-0.02% (17-343μM)浓度范围内有良好的线性关系；采用荧光检测时，在0.0001-0.005%

(1.7-86μM)浓度范围内有良好的线性关系。实际检测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

本试剂盒检测方法灵活，检测速度快。本试剂盒既可以进行荧光检测，也可进行吸光度检测。整个检测过程约1小时即可完成。

本试剂盒提供的检测裂解液有一定的通用性。使用本试剂盒中的Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay裂解获得的细胞或组织样品，也可以用于乐业生产的其它代谢类试剂盒中同样使用Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay进行裂解的样品检测，通用性强；而且还可用于检测蛋白浓度、进行SDS-PAGE或一些较易溶解蛋白的Western检测。

本试剂盒应用范围广。本试剂盒可用于小鼠、大鼠、人等的血清、血浆、尿液等生物体液，细胞培养上清、组织或细胞及饮料样品等的检测。本试剂盒不仅适合少量样本的检测，也非常适合高通量筛选(High-throughput screening)的自动化操作系统。

按照使用说明操作，用于96孔板检测时，本试剂盒小包装可以进行100次检测。

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay	15ml	-20℃
Ethanol Assay Buffer	15ml	-20℃
Amplex Red	200μl	-20℃，避光
Enzyme Solution A	200μl	-20℃
Enzyme Solution B	200μl	-20℃
Ethanol Standard (10%)	500μl	-20℃

注意事项：

1. 由于乙醇氧化酶的底物特异性问题，本试剂盒不仅可以检测乙醇，也可以检测甲醇，且对正丁醇、异丙醇等也有一定的反应。
2. Amplex Red 在空气中不太稳定，开启后应尽快使用，且在使用过程中需注意适当避光。
3. Amplex Red 的反应产物在还原剂的存在下会很不稳定，因此最终反应体系中的二硫苏糖醇(DTT)、β-巯基乙醇或类似还原剂的浓度应低于 10μM。
4. 请确保反应体系的 pH 值在 7-8 之间，否则会影响 Amplex Red 的稳定性和荧光值。
5. 在酒精蒸汽附近存储或使用本试剂盒会造成试剂盒组分吸收酒精，导致高背景。因此本试剂盒在存储和使用时请远离酒精蒸汽。
6. Amplex Red 和 Ethanol Assay Buffer 需要完全解冻并平衡至室温后再使用，否则会影响检测结果。其它各种溶液使用时应在冰上进行。
7. 为减少稀释液产生的荧光背景带来的误差，样品和标准品的稀释液应该根据样品的种类来定。当样品为 Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay 制备的细胞或组织的裂解样品时，应使用 Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay 稀释，当样品为血液等其它样品时，宜使用 Ethanol Assay Buffer 稀释。
8. 血清、血浆等样品如果在 4ºC 保存，保存的时间不得超过 2 周，否则会影响检测结果的准确性。通常血清样品宜在 -20ºC 保存，-80℃保存更佳。
9. 荧光酶标仪检测时须使用适合荧光检测的黑板或白板，推荐使用 Gold™全黑 96 孔细胞培养板(平底带盖，独立包装)或 Gold™黑色透明底 96 孔细胞培养板(平底带盖，独立包装)。
10. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
11. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 样品的准备：

a. 血液样品的准备：对于血清样品，将全血在常温如 25ºC 下放置 30 分钟-2 小时，不要剧烈摇晃以免溶血，待全血自然凝固并析出血清后，4ºC 约 1000-2000×g 离心 10 分钟，取黄色上清即得血清，注意不要吸取白色或淡黄色沉淀；对于血浆样品，将全血用肝素或者 EDTA 进行抗凝，4ºC 约 1000-2000×g 离心 10 分钟，取黄色或淡黄色上清即得血浆，注意不要吸取白色沉淀。血清和血浆都需置于冰上，如果不能立即检测，也可以分装并短期保存于-20ºC 或-80ºC。对于冻存的样品，在检测前解冻后冰浴存放备用，使用前必须混匀。

b. 细胞或组织样品的准备：对于培养的贴壁细胞，PBS 洗涤一次并吸净残留液体。对于培养的悬浮细胞，先适当离心(如 100-500×g，5 分钟)收集细胞到离心管内，弃上清并吸净残留液体。按照每 100 万细胞加入 100-200μl Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay 的比例加入裂解液，适当吹打，冰浴 5-10 分钟以充分裂解细胞。4ºC 约 12,000×g 离心 3-5 分钟，取上清用于后续检测。对于组织样品，按照每 10mg 组织加入 100μl Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay 的比例，使用 TissueMaster™高通量组织研磨仪(1.5/2ml×48) 、TissueMaster™手持式组织研磨仪或玻璃匀浆器在约 4ºC 或冰浴等低温条件下进行匀浆。4ºC 约 12,000×g 离心 3-5 分钟，取上清用于后续检测。以上所有操作均需在 4ºC 或冰上操作。制备好的细胞或组织样品如果不能立即检测，可以-20ºC 或-80ºC 冻存。

c. 细胞培养上清样品的准备：对于贴壁细胞，直接取培养液；对于悬浮细胞，离心取培养液。

2. 试剂盒的准备：

a. 融解 Amplex Red 和 Ethanol Assay Buffer，平衡至室温后混匀备用。其它试剂存放于冰浴备用，使用完毕后宜立即按照试剂盒要求的条件保存。

b. Amplex Red 反应工作液(Working Solution)的配制：按照每个反应 50μl 的体积配制适量的 Amplex Red 反应工作液。均匀混合 44μl Ethanol Assay Buffer、2μl Amplex Red、2μl Enzyme Solution A、2μl Enzyme Solution B，即可配制成 50μl Amplex Red 反应工作液。根据待检测样品(包括标准品)的数量，配制适量的 Amplex Red 反应工作液。具体配制方法参考下表。配制好的 Amplex Red 反应工作液如果置于 4ºC 或冰浴避光保存，可以在当天使用，但建议尽量现配现用。

Samples	1	10	20	50
Ethanol Assay Buffer (μl)	44	440	880	2200
Amplex Red (μl)	2	20	40	100
Enzyme Solution A (μl)	2	20	40	100
Enzyme Solution B (μl)	2	20	40	100
Working Solution (μl)	50	500	1000	2500

注 1：由于酶溶液的用量较少且易沉降，必须注意在使用前先轻轻离心一下，然后适当混匀后再使用。

注 2：H_2O_2 的存在会对乙醇的检测产生干扰。如果样品含有 H_2O_2，需同时设置样品背景对照孔，加入不含 Enzyme Solution A 的 Amplex Red Working Solution，即配制 Amplex Red Working Solution 时 2μl Enzyme Solution A 用 Ethanol Assay Buffer 替代。计算时样品孔的读数值需要减去样品背景对照孔的读数。

3. 样品测定：

a. 乙醇标准曲线设置(吸光度或荧光检测，可选取其中的一种，对于样品量较少或浓度较低的情况，优先推荐采用荧光检测)。

1) 吸光度检测：取 4μl Ethanol Standard (10%)，加入 96μl Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay 或者 Ethanol Assay Buffer (如果检测 Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay 制备的细胞或组织样品，可以使用 Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay；如果检测血液、上清等无需处理的样品，可以使用 Ethanol Assay Buffer)，混匀，配制成浓度为 0.4%的乙醇标准溶液。再取 0.4%的乙醇标准溶液 10μl，加入 190μl Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay 或者 Ethanol Assay Buffer，混匀，配制成浓度为 0.02%的乙醇标准溶液。分别取 0.02%的乙醇标准溶液 0、2.5、5、12.5、25、50μl 加入 96 孔板的标准品孔中，并相应地用 Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay 或 Ethanol Assay Buffer 补足至 50μl，此时，标准曲线的浓度分别为 0.001、0.002、0.005、0.01、0.02%。

注：吸光度检测时建议使用透明 96 孔板。

2) 荧光检测：取 5μl Ethanol Standard (10%)，加入 195μl Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay 或者 Ethanol Assay Buffer (如果检测 Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay 制备的细胞或组织样品，可以使用 Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay；如果检测血液、上清等无需处理的样品，可以使用检 Ethanol Assay Buffer)混匀，配制成浓度为 0.25%的乙醇标准溶

液。再取 0.25%的乙醇标准溶液 4μl，加入 196μl Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay 或 Ethanol Assay Buffer，混匀，配制成浓度为 0.005%的乙醇标准溶液。分别取 0.005%的乙醇标准溶液 0、2.5、5、10、20、50μl 加入 96 孔板的标准品孔中，并相应地用 Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay 或 Ethanol Assay Buffer 补足至 50μl，此时，标准曲线的浓度分别为 0、0.0002、0.0005、0.001、0.002、0.005%。

注：荧光检测时建议使用 96 孔黑板。

b. 取 1-50μl 样品或稀释后的样品至 96 孔板样品孔中，并相应地加入 Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay 或 Ethanol Assay Buffer 至样品孔中，补足至 50μl。同时设置仅含 Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay 或 Ethanol Assay Buffer 的孔为空白对照。

注：为确保样品数值在标准曲线范围内，建议进行预实验将样品设置多个稀释倍数，以确定样品中乙醇的大致浓度，如果数值不在标准曲线范围内，请调整样品的稀释倍数或者样品的量。如果检测 Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay 制备的细胞或组织裂解样品，请使用 Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay 稀释；如果检测血液、上清等无需裂解处理的样品，可以使用 Ethanol Assay Buffer 稀释。样品总稀释倍数记为 n (例如本步骤中对样品进行了 10 倍稀释，加入的“稀释后的样品” 为 25μl，则 n=10×50/25=20)。

c. 各孔加入 Amplex Red 反应工作液 50μl，混匀，37ºC 避光反应 30 分钟。

注：如果吸光度偏低或荧光偏弱，可适当延长反应时间，例如反应 45 或 60 分钟。

d. 如果使用吸光度检测，测定 A570；如果使用荧光检测，设置激发波长为 560nm，发射波长为 590nm 进行荧光强度检测。

e. 建立标准曲线，并计算样品中乙醇的浓度(A)，如果样品的背景对照信号比较高，样品的信号值应减去样品背景对照的信号值。乙醇标准曲线可以参考图 2，吸光度检测在 0.001-0.02% (0.17-3.43mM)浓度范围内有良好的线性关系，荧光检测在 0.0001-0.005% (17.16-857.5μM)浓度范围内有良好的线性关系。乙醇浓度的计算公式如下： $C(\%) = A \times n$

注：A 为步骤 3e 根据标准曲线确定的乙醇浓度(%)；

n 为步骤 3b 样品总稀释倍数。

保存条件：

-20ºC 保存，一年有效。其中 Amplex Red 须避光保存。

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