

甲醇(methanol)含量检测试剂盒说明书

(货号: BP10232W 微板法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

甲醇(methanol)在醇氧化酶作用下生成甲醛, 接着与 2,4-戊二酮反应显色, 该有色物质在 412nm 下有特定吸收峰; 通过计算得到甲醇含量。

二、试剂盒组成和配制:

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	液体 6mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 1 支	-20℃避光保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 0.56mL 试剂一混匀溶解, 分装 -20℃冻存, 禁止反复冻融。
试剂三	试剂 A 液体 1 支 试剂 B(空瓶)×2 瓶	4℃避光保存	1. 临用前吸取 7mL 的试剂四至一瓶试剂 B 中; 2. 再吸取 300μL 的试剂 A 至试剂 B 中, 混匀溶解做为试剂三备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	液体 15mL×1 瓶	4℃避光保存	

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 组织样本: 称取约 0.1g 组织(水分含量高的样本可取约 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清置冰上待测。

【注】: 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 提取液, 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(10^4): 提取液(mL)为 500~1000:1 的比例进行提取。

- ③ 液体样本: 澄清的液体可直接检测, 若浑浊可离心后取上清检测。

2、检测步骤:

- ① 打开酶标仪, 调节波长至 412nm; 在 EP 管中依次加入:

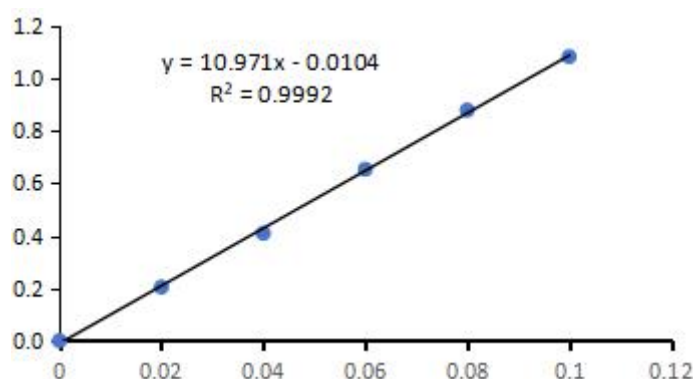
试剂组分 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
样本	100	
蒸馏水		100
试剂一	90	90
试剂二	10	10

混匀，于 30°C 条件下，孵育 20min		
试剂三	200	200
混匀，60°C 条件下，孵育 15min。（若有明显的浑浊现象可于 8000rpm 室温离心 5min），取出 200μL 至 96 孔板中，于 412nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

【注】：若 ΔA 小于 0.01，可增加待检液加入量 V_1 （如由 100μL 增至 150μL，则试剂一相应减少），或者增加样本取样质量 W ，则改变后的 V_1 和 W 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 10.971x - 0.0104$ ， x 为标准品浓度（μmol）， y 是 ΔA 。



2、按照样品质量计算：

$$\text{甲醇含量}(\mu\text{mol/g}) = [(\Delta A + 0.0104) \div 10.971 \div V_1 \times V] \div W \times D = 0.911 \times (\Delta A + 0.0104) \div W \times D$$

$$\text{甲醇含量}(\mu\text{g/g}) = [(\Delta A + 0.0104) \div 10.971 \div V_1 \times V] \div W \times D \times Mr = 29.2 \times (\Delta A + 0.0104) \div W \times D$$

3、按照蛋白浓度计算：

$$\text{甲醇含量}(\mu\text{mol/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0104) \div 10.971 \div V_1 \times V] \div C_{pr} \times D = 0.911 \times (\Delta A + 0.0104) \div C_{pr} \times D$$

$$\text{甲醇含量}(\mu\text{g/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0104) \div 10.971 \div V_1 \times V] \div C_{pr} \times D \times Mr = 29.2 \times (\Delta A + 0.0104) \div C_{pr} \times D$$

4、按细胞数量计算：

$$\text{甲醇含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0104) \div 10.971 \div V_1 \times V] \div \text{细胞数量} \times D$$

$$= 0.911 \times (\Delta A + 0.0104) \div \text{细胞数量} \times D$$

$$\text{甲醇含量}(\mu\text{g/g}) = [(\Delta A + 0.0104) \div 10.971 \div V_1 \times V] \div \text{细胞数量} \times D \times Mr$$

$$= 29.2 \times (\Delta A + 0.0104) \div \text{细胞数量} \times D$$

5、按照液体体积计算：

$$\text{甲醇含量}(\mu\text{mol/g}) = (\Delta A + 0.0104) \div 10.971 \div V_1 \times D = 0.911 \times (\Delta A + 0.0104) \times D$$

$$\text{甲醇含量}(\mu\text{g/g}) = (\Delta A + 0.0104) \div 10.971 \div V_1 \times D \times Mr = 29.2 \times (\Delta A + 0.0104) \times D$$

W ---样本重量，g；

V ---加入提取液体积，1mL；

V_1 ---样本体积，0.1mL；

Mr ---甲醇分子量，32.04；

500---细胞数量，万；

D ---稀释倍数，未稀释即为 1。

附：标准曲线制作过程：

- 1 取 0.105mL 分析级甲醇（自备， $Mr=32.04$ ）至 4.9mL 蒸馏水中，混匀即得 0.5mmol/mL 甲醇标准品母液。（现配现用）。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0，0.2，0.4，0.6，0.8，1 μmol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 2 标品稀释参照表如下：

1. 吸取标准品母液 20uL，加入 980uL 蒸馏水，混匀得到 10μmol/mL 的标品稀释液；						
2. 吸取 10μmol/mL 的标品稀释液 100uL，加入 900uL 蒸馏水，混匀得到 1μmol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μmol/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据测定管加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	100	
蒸馏水		100
试剂一	90	90
试剂二	10	10
混匀，于 30°C 条件下，孵育 20min		
试剂三	200	200
混匀，60°C 条件下，孵育 15min。（若有明显的浑浊现象可于 8000rpm 室温离心 5min），取出 200μL 至 96 孔板中，于 412nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		