

乙醇（Ethanol）含量测定试剂盒说明书

（货号：BP10234F 紫外法 48 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

乙醇在自然界中无处不在，如食品，果实，酒类，药品，化妆品等；本试剂盒利用乙脱氢酶使乙醇转化为乙醛，同时伴随 NADH 生成；由于乙醇脱氢酶利于乙醇的生成而不是分解，本试剂盒额外添加特异试剂使乙醇脱氢酶能够彻底分解乙醇，进一步通过检测 NADH 在 340nm 的上升量计算出样本中乙醇含量。

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
试剂一	液体 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 1.6mL 蒸馏水溶解，可 -20℃分装保存，禁止反复冻容；
试剂二	粉剂 1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 1.8mL 蒸馏水溶解备用 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 32mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 1.1mL 蒸馏水混匀备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

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）、1ml 石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、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 称取约 0.2g 组织（水分含量高的样本可取约 0.5g），加入 1mL 蒸馏水，进行冰浴匀浆，12000rpm，室温离心 10min，取上清液待测。（若组织样本蛋白含量很高，可进行脱蛋白处理）

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 5~10：1 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 蒸馏水，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（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000:1 的比例进行提取。

- ③ 液体样品：澄清的液体样本直接检测，若浑浊则离心后取上清液检测。

2、检测步骤：

- ① 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃）或水浴锅（25℃）孵育 15-20min。
- ③ 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管
样本	30
试剂一	30
试剂二	30
试剂三	635
混匀, 室温 (25℃) 孵育 10min, 于 340nm 处读取 A1 值,	
试剂四	15
混匀, 室温 (25℃) 反应 30min, 于 340nm 处读取 A2 值, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】若 ΔA 的值在零附近徘徊, 可以增加样本量 $V1$ (相应的试剂三减少) 或样本制备的时候, 增加样本质量 W , 则改变后的 $V1$ 或 W 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、按照样品质量计算:

$$\text{乙醇含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^6] \div (W \times V1 \div V) \div 2 = 91.35 \times \Delta A \div W$$

2、按细胞数量计算:

$$\text{乙醇含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^6] \div (500 \times V1 \div V) \div 2 = 91.35 \times \Delta A \div 500$$

3、按照液体体积计算:

$$\text{乙醇含量}(\mu\text{g/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^6] \div V1 \div 2 = 91.35 \times \Delta A$$

4、按照蛋白浓度计算:

$$\text{乙醇含量}(\mu\text{g/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^6] \div (Cpr \times V1 \div V) \div 2 = 91.35 \times \Delta A \div Cpr$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d ---光径, 1cm;

V ---加入提取液体积, 1 mL;

$V1$ ---加入反应体系中样本体积, 0.03mL;

$V2$ ---反应总体积, $7.4 \times 10^{-4} \text{ L}$;

Mr ---乙醇分子量, 46.07;

W ---样本质量, g;

2---1 分子乙醇产生 2 分子 NADH;

500---细胞数量, 万;

Cpr ---蛋白浓度 (mg/mL) ; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。