

乙醇 (Ethanol) 含量测定试剂盒说明书

(货号: G0866F 紫外分光法 48 样)

一、产品简介:

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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部,再加 1.6mL 蒸馏水溶解,可-20℃分装保存,禁止反复冻容;
试剂二	粉剂 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部,再加 1.8mL 蒸馏水溶解备用;
试剂三	液体 32mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 μL×1 支	-20℃保存	临用前甩几下使液体落入底部,再加 1.1mL 蒸馏水混匀备用。

三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿(光径 1cm)、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰、蒸馏水。

四、乙醇 (ethanol) 含量测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

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(10^4):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、上机检测:

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:

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

- 【注】1. 若 ΔA 值小于 0.01, 可以增加样本量 V1 (如增加至 80μL, 则试剂三相应减少), 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。
2. 若 A2 值大于 1.5 或 ΔA 大于 1 或 30min 时读取 A2 值时 (若 A 值继续增加, 如 2 分钟内的吸光值变化在 0.1 左右), 则表明样本中的乙醇含量可能偏高, 可对样本用蒸馏水稀释后继续再检测。

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:

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

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。