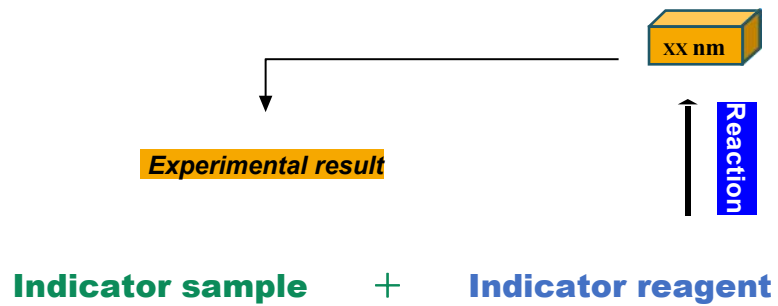


上海茁彩生物科技有限公司  
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

## 乙醇含量测定试剂盒说明书

### 微量法

**注意：**正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

#### 测定意义：

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。我国是世界上最早发明酿酒的国家，也是酒类产品消费大国，其消费量居世界之首。因此，快速、准确测定酒中乙醇含量，对于确保酒的质量和保护消费者的健康具有重大意义。

#### 测定原理：

乙醇在乙醇脱氢酶的催化下氧化脱氢生成乙醛，同时，NAD 被还原生成 NADH，NADH 在1-mPMS 的作用下使 WST-8 显橙黄色，通过 450 nm 下测定吸光值变化可测得乙醇含量。

#### 需自备的仪器和用品：

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96 孔板、研钵、冰、蒸馏水。

#### 试剂的组成和配制：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 12 mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	粉剂×1 瓶	-20℃保存	临用前加入 6 mL 试剂三充分溶解待用，用不完的试剂分装后-20℃保存；
试剂三	液体 10 mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂四	液体 1.5mL×1 管	4℃避光保存	-

#### 乙醇提取：

1. 组织：按照组织质量（g）：蒸馏水体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 蒸馏水），进行匀浆，8000g，25℃离心 10min，取上清待测。
2. 细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（ $10^4$  个）：蒸馏水体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 蒸馏水），超声波破碎（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次），8000g，25℃离心 10min，取上清待测。
3. 血清（浆）等液体样品：直接测定。

### 测定步骤:

1. 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 450nm。
2. 工作液的配制: 临用前按照样本数量, 按以下比例配制工作液

试剂名称	体积 (μL)
试剂一	100
试剂二	50
试剂四	10

### 3. 样本测定

按下表在 96 孔板中加入如下试剂

试剂名称	体积 (μL)
样本	40
测定工作液	160

混匀后记录 450nm 下测定初始吸光值 A1, 和 37°C避光孵育 10min 后的吸光值 A2, 计算 $\Delta A=A2-A1$ 。

### 乙醇含量计算:

标准条件下测定回归方程为  $y = 0.0256x + 0.0055$   $R^2 = 0.9991$ ;  $x$  为乙醇含量 ( $\mu\text{mol/mL}$ ),  $y$  为吸光值差值 $\Delta A$ 。

#### 1. 按照血清(浆)体积计算

$$\text{乙醇含量} (\mu\text{mol/mL}) = (\Delta A - 0.0055) \div 0.0256 = 39.1 \times (\Delta A - 0.0055)$$

#### 2. 按照样品质量计算

$$\begin{aligned} \text{乙醇含量} (\mu\text{mol/g 鲜重}) &= [(\Delta A - 0.0055) \div 0.0256 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) \\ &= 39.1 \times (\Delta A - 0.0055) \div W \end{aligned}$$

#### 3. 按照细菌或细胞密度计算

$$\begin{aligned} \text{乙醇含量} (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A - 0.0055) \div 0.0256 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) \\ &= 0.078 \times (\Delta A - 0.0055) \end{aligned}$$

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.04mL; V2: 加入提取液体积, 1 mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万;

### 注意事项:

测定前取 1-2 个样做预实验, 若 $\Delta A > 0.3$  或乙醇含量  $> 10 \mu\text{mol/mL}$ , 需将样本用蒸馏水稀释后再测定, 以确保测定的准确性。

最低检测限:  $0.02 \mu\text{mol/mL}$ 。