

乙醇检测试剂盒说明书

(货号: PB1187W48 微量法)

有效期: 3 个月

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!

检测原理:

酒精(乙醇 C_2H_5OH)是最广泛使用的饮料之一, 低剂量的酒精可能有助于血液循环, 而大量饮酒可能导致各种疾病, 血液中乙醇含量测定是酒精中毒 的重要判断依据, 通过对摄入酒精后血中乙醇含量的测定, 可方便迅速地监测和研究乙醇在体内的代谢过程, 从而为预防和减轻酒精中毒的研究提供相应的指标和依据。

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 $NADH$, $NADH$ 在递氢物质的作用下使 WST-8 显橙黄色, 通过 450nm 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、水浴锅、离心机、可调式移液器、96 孔板、蒸馏水

试剂的组成和配制:

试剂一: 液体 25ml $\times$ 1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 液体 4ml $\times$ 1 瓶, -20℃ 避光保存;

试剂三: 液体 80 μ l $\times$ 支, -20℃ 避光保存; 每支使用前加入 720 μ l 试剂一, 混匀后使用。

试剂四: 液体 2ml $\times$ 1 瓶, 4℃ 保存;

试剂五: 0.1mol/L 盐酸溶液 (110ml); 自备;

标准品: 液体 1ml $\times$ 1 支, 10 μ mol/ml 标准品溶液, -20℃ 保存。

样本制备:

- ① 称取约 0.2g 组织 (水分充足的样本可取约 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。

【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。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。

测定步骤:

1、酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 450nm。

2、工作液配置：试剂四：试剂二：试剂一（0.5：1：5）的比例混合，根据用量现用现配。

3、标准曲线的制备：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度($\mu\text{mol/mL}$)	0	2	3	4	6	8	9	10
10 $\mu\text{mol/mL}$ 标准品(μL)	0	40	60	80	120	160	180	200
蒸馏水(μL)	200	160	140	120	80	40	20	0

4、加样表：在 EP 管中依次加入

试剂 (μL)	标准管	测定管	对照管
样本	—	20	20
标准品	20	—	—
工作液	200	200	200
试剂三	10	10	—
试剂一	—	—	10
37℃避光孵育 10min			
试剂五	1000	1000	1000
混匀，于 450nm 处波长处读取吸光度，分别记为 A 测定管，A 标准管，A 对照管，计算 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管； ΔA 标准=A 标准管-A 标准管（0 $\mu\text{mol/ml}$ ）。			

乙醇含量计算：

1、标准曲线的绘制 以各标准溶液浓度为 x 轴，以其对应的吸光值（ ΔA 标准）为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 测定带入公式中得到 x（ $\mu\text{mol/ml}$ ）。

2、乙醇含量计算

（1）按照液体体积计算

$$\text{乙醇含量} (\mu\text{mol/ml}) = x = (\Delta A \text{ 测定} - b) \div k \times f$$

（2）按照样品质量计算：

$$\text{乙醇含量} (\mu\text{mol/g 鲜重}) = x \times V \text{ 样总} \div W = (\Delta A \text{ 测定} - b) \div k \times V \text{ 样总} \div W \times f$$

（3）按细胞数量计算：

$$\text{乙醇含量} (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = x \times V \text{ 样总} \div 500 = (\Delta A \text{ 测定} - b) \div k \times V \text{ 样总} \div 500 \times f$$

（4）按照样本蛋白浓度计算

$$\text{乙醇含量} (\mu\text{mol/mg prot}) = x \div \text{Cpr} = (\Delta A \text{ 测定} - b) \div k \div \text{Cpr} \times f$$

W：样本质量，g；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL，蛋白浓度需自行测定；V 样总：加入的提取液



体积，1mL；f：样本加入检测体系前的稀释倍数；500：细胞、细菌数量，万。

注意事项：

- 1、加入反应工作液后，酶标板需要避光。
- 2、反应工作液需在标准品和样品加入板孔后再配制。