

乙酸 (Acetic acid) 含量测定试剂盒说明书

(货号: BN73021 紫外法 24 样)

一、产品简介:

乙酸 (Acetic acid) 在食品、饮料和其他材料中的普遍存在, 是重要的检测指标之一。

乙酸 (Acetic acid) 在乙酸激酶和磷酸转乙酰酶的相继作用下, 使乙酸和 ATP 转变成乙酰辅酶 A 和 ADP, 继而在丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶依次催化 NADH 氧化生成 NAD⁺, 通过检测 340nm 下 NADH 的下降量, 进而计算得到乙酸含量的多少。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×1 瓶	4℃保存	用前甩几下使试剂落入底部, 再加 3mL 的蒸馏水溶解备用。
试剂二	粉剂 mg×2 支	-20℃保存	每支临用前甩几下使试剂落入底部, 再加 0.6mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后 -20℃保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂三	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加 0.6mL 的蒸馏水溶解备用, 可分装冻存, 禁止反复冻融。
试剂四	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加 0.6mL 的蒸馏水溶解备用, 可分装冻存, 禁止反复冻融。
试剂五	液体 μL×1 支	-20℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加 0.6mL 的蒸馏水溶解备用, 可分装冻存, 禁止反复冻融。
试剂六	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加 0.6mL 的蒸馏水溶解备用。
试剂七	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加 0.6mL 的蒸馏水溶解备用, 可分装冻存, 禁止反复冻融。
标准品	液体 mL×1 支	4℃保存	仅用来鉴定试剂盒中试剂是否正常 (不参与结果计算)。 使用方法: 该标准品 (乙酸) 浓度为 24μmol/mL, 用前再用蒸馏水稀释 24 倍成 1μmol/mL 备用; 按照加样表中的测定管操作 (样本更换成备用浓度的标准品)。

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)、低温台式离心机、恒温培养箱、可调式移液器、研钵、水浴锅、冰。

四、乙酸含量测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品和实验流程, 避免样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 生物组织样本: 称取约 0.1g 组织 (水分充足的果实样本取约 0.5g 组织或更多), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。可于 80℃条件下孵育 20min (可使组织样本中干扰测定的酶蛋白变性失活)。取出冷却至室温后, 再于 12000rpm, 室温离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若是非生物组织样本如食品等, 可冰浴匀浆后, 直接于 12000rpm, 室温离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

② 液体样品：

- 近似中性的液体可直接取 1mL 至 EP 管中；12000rpm，离心 10min，上清液待测。
- 酸性液体(PH<5)样本，则需先用 KOH (2M) 调溶液的 PH 值至约 7.5，并在室温下孵育 30 分钟。取 1mL 转移到 EP 管中；12000rpm，离心 10min，上清液待测。
- 若蛋白浓度比较高的样本如牛乳等，可直接取 1mL 牛乳液体样本至 EP 管中，于 80℃条件下孵育 20min（可使部分蛋白变形沉淀析出）。取出冷却至室温后，再于 12000rpm，室温离心 10min，取上清，置冰上待测。

③ 细胞/细菌样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心弃上清；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液；冰浴超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3S，间隔 10S，重复 30 次）；12000rpm，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

2、上机检测：

- 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- 试剂解冻至室温（25℃），或可放在 25℃条件下水浴 5-15min。
- 依次在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中加入：

试剂名称（μL）	测定管
样本	60
提取液	400
试剂一	100
试剂二	40
试剂三	20
试剂四	20
试剂五	20
试剂六	20
混匀，于室温（25℃）下孵育 5min 后于 340nm 处读取 A1 值。	
试剂七	20
混匀，于室温（25℃）下孵育 10min 后于 340nm 处读取 A2(直到 2min 内 A2 值变化小于 0.02)， $\Delta A = A1 - A2$ 。	

五、结果计算：

1、按样本重量计算：

$$\text{乙酸含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr] \div (W \times V1 \div V) \times D = 112.6 \times \Delta A \div W \times D$$

$$\text{乙酸含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6] \div (W \times V1 \div V) \times D = 1.88 \times \Delta A \div W \times D$$

2、按照液体体积计算：

$$\text{乙酸含量}(\mu\text{g/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr] \div V1 \times D = 112.6 \times \Delta A \times D$$

3、按细菌/细胞密度计算：

$$\text{乙酸含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr] \div (500 \times V1 \div V) \times D = 112.6 \times \Delta A \div 500 \times D$$

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---加入样本体积，0.06mL；

V2---反应总体积；0.7mL= $7 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

Mr---乙酸分子量；60.05。

500---细胞数量，万；

W---样本质量，g。