

## 乙酸 (Acetic acid) 含量测定试剂盒说明书

(微板法 48 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<sup>+</sup>, 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 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 mg×1 瓶	4°C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°C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°C保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂三	粉剂 mg×1 支	-20°C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°C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°C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°C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°C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°C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 24 μmol/mL, 用前再用蒸馏水稀释 24 倍成 1 μmol/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:

酶标仪、96 孔板、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°C 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。

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

② 液体样品：

- a. 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。
- b. 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。
- c. 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°C 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°C 离心 10min，取上清液，置冰上待测。

【注】：也可按照细菌或细胞数量( $10^4$  个):提取液体积(mL)为 500~1000:1 的比例进行提取。

2、上机检测：

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。
- ② 试剂解冻至室温（25°C），或可放在 25°C 条件下水浴 5-15min。
- ③ 试剂一和二和三和四和五和六可按照 40:20:10:10:10:10 比例配成混合液（一枪加 100μL 该混合液）（该混合液用多少配多少，现配现用）。依次在 96 孔板中加入：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	20
提取液	70
试剂一	40
试剂二	20
试剂三	10
试剂四	10
试剂五	10
试剂六	10
混匀，于室温（25°C）下孵育 5min 后于 340nm 处读取 A1 值。	
试剂七	10
混匀，于室温（25°C）下孵育 10min 后于 340nm 处读取 A2(直到 2min 内 A2 值变化小于 0.02)， $\Delta A = A1 - A2$ 。	

- 【注】：1. 测定管的 A1 值若超过 2（如样本自身颜色较深），可把样本用蒸馏水稀释后再检测，稀释倍数 D 代入计算公式。
2. 若  $\Delta A$  小于 0.01，可增加样本量 V1（如增至 40μL，则提取液相应减少，保持总体积不变），或增加样本取样质量 W，则改变后的 V1 和 W 需代入公式重新计算。
  3. 若  $\Delta A$  差值大于 0.4 或若 A2 值小于 0.4，须减少样本量 V1（如减至 10μL，则提取液相应增加，保持总体积不变），或对样本用蒸馏水稀释后再检测，则改变后的 V1 和稀释倍数 D 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本重量计算：

$$\text{乙酸含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr] \div (W \times V1 \div V) \times D = 193.1 \times \Delta A \div W \times D$$

$$\text{乙酸含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6] \div (W \times V1 \div V) \times D = 3.22 \times \Delta A \div W \times D$$

2、按照液体体积计算：

$$\text{乙酸含量}(\mu\text{g/mL})=[\Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times \text{Mr}] \div V1 \times D = 193.1 \times \Delta A \times D$$

3、按细菌/细胞密度计算：

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

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

$d$ ---96 孔板光径， $0.5\text{cm}$ ；

$V$ ---加入提取液体积， $1 \text{ mL}$ ；

$V1$ ---加入样本体积， $0.02\text{mL}$ ；

$V2$ ---反应总体积； $0.2\text{mL}=2 \times 10^{-4}\text{L}$ ；

$\text{Mr}$ ---乙酸分子量； $60.05$ ；

$500$ ---细胞数量，万；

$W$ ---样本质量， $\text{g}$ 。