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+, 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℃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	液体0.55mL×1支	-20℃保存	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：

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℃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℃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。

【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℃),或可放在25℃条件下水浴5-15min。

③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℃)下孵育5min后于340nm处读取A1值。	
试剂七	10
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)，△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△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△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：

乙酸含量(μg/g鲜重)=[△A÷(e×d)×V2×10^6×Mr]÷(W×V1÷V)×D=193.1×△A÷W×D

乙酸含量(μmol/g 鲜重)=[△A÷(e×d)×V2×10^6÷(W×V1÷V)×D=3.22×△A÷W×D

2、 按照液体体积计算：

乙酸含量(μg/mL)=[△A÷(exd)×V2×10^6×Mr]÷V1×D=193.1×△A×D

3、按细菌/细胞密度计算：

乙酸含量（μg/10^4cell)=[△A÷(e×d)×V2×10^6×Mr]÷(500×V1÷V)×D=112.6×△A÷500×D

E---NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L/mol/cm;

d---96 孔板光径，0.5cm;

V---加入提取液体积，1mL;

V1---加入样本体积，0.02mL;

V2---反应总体积；0.2mL=2×10-4L;

Mr---乙酸分子量；60.05;

500---细胞数量，万；

W---样本质量，g。