

乙酸（Acetic acid）含量测定试剂盒说明书

（货号：G0893W 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	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：

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：

- 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°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。

2、上机检测：

- 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。
- 试剂解冻至室温（25°C），或可放在 25°C 条件下水浴 5-15min。
- 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。
- 若 ΔA 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。
 - 若 ΔA 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：

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

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

d---96 孔板光径，0.5cm；

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.02mL；

V2---反应总体积； $0.2\text{mL} = 2 \times 10^{-4}\text{L}$ ； W---样本质量，g； Mr---乙酸分子量；60.05。