（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!）

产品货号：E-BC-K891-M

产品规格：48T(32 samples)/ 96T(80 samples)

检测仪器：酶标仪(440-460 nm)

Elabscience®乙醇比色法测试盒

Ethanol Colorimetric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100
邮箱：biochemical@elabscience.cn
网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清(浆)、酒类等液体中乙醇的含量。

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 450 nm 下测定吸光值变化可测得乙醇含量。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 A (Buffer Solution A)	10 mL×1 瓶	20 mL×1 瓶	-20°C 保存 3 个月
试剂二 (Reagent 2)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 3 个月
试剂三 (Reagent 3)	缓冲液 B (Buffer Solution B)	7 mL×1 瓶	14 mL×1 瓶	-20°C 保存 3 个月
试剂四 (Reagent 4)	底物 (Substrate)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 3 个月
试剂五 (Reagent 5)	显色剂 (Chromogenic Agent)	1.5 mL×1 支	1.5 mL×2 支	-20°C 避光 保存 3 个月
试剂六 (Reagent 6)	10 μmol/mL 标准品溶液(10 μmol/mL Standard Solution)	1.8 mL×1 支	1.8 mL×2 支	-20°C 保存 3 个月
	96 孔酶标板	48 孔×1 块	96 孔×1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张		

	样本位置标记表	1 张	

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(440-460 nm，最佳检测波长 450 nm)，恒温箱(37°C)

试剂准备

① 检测前，试剂二放置于冰盒待用，其它试剂平衡至室温。

② 试剂二工作液配制：

每支试剂二加入180 μL双蒸水溶解，混匀，室温避光静置30 min后使用，2-8°C可避光保存4天。

③ 试剂四工作液的配制：

每支试剂四加入170 μL双蒸水溶解，混匀，-20°C可避光保存4天。

④ 反应工作液的配制：

按照试剂一：试剂二工作液：试剂三：试剂四工作液：试剂五体积比为80: 1: 37: 2: 8的比例混匀，避光待用，现配现用，按需配制，配好的反应工作液需在0.5 h内使用。（反应工作液在标准品和样本加入板孔后配制）

⑤ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(μmol/mL)	**0**	**2**	**3**	**4**	**6**	**8**	**9**	**10**
10μmol/mL 标准品(μL)	0	40	60	80	120	160	180	200
双蒸水(μL)	200	160	140	120	80	40	20	0

样本准备

① 样本处理

血清血浆样本：直接测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.27-10.0 μmol/mL，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
啤酒 （酒精含量 2.8%）	60-100	白葡萄酒 （酒精含量 12%）	250-300

注：样本稀释液为双蒸水。

实验关键点

① 加入反应工作液时避免酶标孔内有气泡。

② 加入反应工作液后，酶标板需要避光。

③ 每支试剂二加入 180 μL 双蒸水溶解后，需室温避光静置 30 min 后再使用。

④ 反应工作液需在标准品和样品加入板孔后再配制。

操作步骤

① 标准孔：取 40 μL 不同浓度的标准品溶液加入相应的酶标孔中。
测定孔：取 40 μL 待测样本加入测定孔中。

② 向步骤①中各孔依次加入 160 μL 反应工作液。

③ 振板 3 s, 酶标仪 450 nm 下测得各孔初始 OD 值 A_1 (2 min 内检测完)。

④ 37°C 避光孵育反应 10 min。

⑤ 酶标仪于 450 nm 波长测定各孔 OD 值 A_2，计算 OD 变化值△A(△A = A_2 - A_1)。

操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度标准品(μL)	40	--
待测样本 (μL)	--	40
反应工作液(μL)	160	160
振板 3 s，酶标仪 450 nm 波长测定各孔初始 OD 值 A_1。		
37°C 下避光孵育反应 10 min。		
酶标仪于 450 nm 波长测定各孔 OD 值 A_2，计算变化 OD 值△A (△A = A_2 - A_1)。		

结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

液体样本中乙醇含量计算公式：

$$\text{乙醇含量 (μmol/mL)} = (\Delta A_{450} - b) \div a \times f$$

注解：

y：标准孔$\Delta A_{标}$-空白孔$\Delta A_{空}$(标准品浓度为 0 时 OD 变化值)

x：标准品的浓度

a：标曲的斜率

b：标曲的截距

ΔA_{450}：测定孔$\Delta A_{样}$-空白孔$\Delta A_{空}$(标准品浓度为 0 时 OD 变化值)

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

附录1 关键数据

1. 技术参数

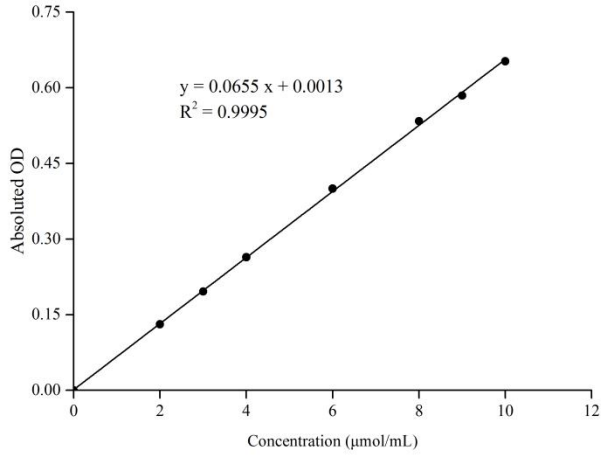
检测范围	0.27–10.0 μmol/mL	**平均批间差**	5.0 %
灵敏度	0.27 μmol/mL	**平均批内差**	3.5 %
平均回收率	96%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品加样量40 μL，按照操作步骤进行实验，各点OD值如下表所示：

标准品浓度 (μmol/mL)	0	2	3	4	6	8	9	10
A_1	0.050	0.061	0.067	0.073	0.088	0.101	0.107	0.115
	0.050	0.061	0.067	0.072	0.086	0.104	0.102	0.111
A2	0.066	0.206	0.278	0.352	0.507	0.660	0.700	0.783
	0.066	0.210	0.280	0.353	0.499	0.645	0.710	0.780
ΔA 值	0.016	0.145	0.211	0.279	0.419	0.559	0.593	0.668
	0.016	0.149	0.213	0.281	0.413	0.541	0.608	0.669
平均ΔA 值	0.016	0.147	0.212	0.280	0.416	0.550	0.601	0.669
绝对ΔA 值	0.000	0.131	0.196	0.264	0.400	0.534	0.585	0.653

②绘制标曲(如下图)：



附录2 实例分析

例如测定啤酒(标注酒精含量≥2.8%，≥476 μmol/mL) (数据仅供参考)：

取稀释100倍后的啤酒样本40 μL，按操作表操作，结果如下：

标准曲线：y = 0.0655 x + 0.0013，空白孔A_1值为0.05，A_2值为0.066，$\Delta A_{空}$为0.016，测定孔A_1值为0.065，A_2值为0.434，$\Delta A_{样}$为0.369，计算结果为：

$$\text{乙醇含量 (μmol/mL)} = (0.369 - 0.016 - 0.0013) \div 0.0655 \times 100 = 536.95\ \text{μmol/mL}$$

附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
复孔差异大	样本加入量差异较大	减小样本量差异
	工作液加入量差异较大	使用移液器时注意减小工作液加入量差异
	反应体系有气泡	消除气泡或重新检测
	反应过程酶标板未避光	加完试剂和 A_1 检测完毕酶标板须及时避光
	样本稀释倍数较大	重新处理样本，提高样本匀浆浓度
样本测不出值	工作液未避光	工作液存放须避光
空白孔初始 OD 值 A_1>0.5	工作液放置时间太久	工作液按需配置，现配现用

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

附录4 客户发表文献

1. Shen H, Zhou L, Zhang H, et al. Dietary fiber alleviates alcoholic liver injury via Bacteroides acidifaciens and subsequent ammonia detoxification[J]. Cell Host & Microbe, 2024, 32(8):23. DOI: 10.1016/j.chom.2024.06.008.
2. Chen Y, Yu M, Liu M, et al. A Solvent Exchange Induced Robust Wet Adhesive Hydrogels to Treat Solid Tumor Through Synchronous Ethanol Ablation and Chemotherapy[J]. Advanced Science, 2024, 11(24). DOI:10.1002/advs.202309760.
3. Cheng S, Xueheng C, Yong C, et al. Alpha-lipoic Acid Protects Against Chronic Alcohol Consumption-induced Cardiac Damage by the Aldehyde Dehydrogenase 2–associated PINK/Parkin Pathway[J]. Journal of cardiovascular pharmacology. 2023(5): 82. DOI: 10.1097/FJC.0000000000001480.