

β-羟丁酸含量（酶比色法）检测试剂盒说明书

（货号：G1226F 分光法 24 样）

一、产品简介：

β-羟丁酸在检测糖尿病酮症酸中毒诊断、治疗中有重要意义，对糖尿病的早期诊断也有重要意义。

β-羟丁酸在β-羟丁酸脱氢酶催化下生成乙酰乙酸。同时氧化型辅酶I被还原成还原型辅酶I即 NADH，NADH 接着与 WST-8 显色剂生成于 450nm 有特征吸收峰的物质，通过检测该物质于 450nm 处的增加量，即可计算出样本中β-羟丁酸含量。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	粉体 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加 1.6mL 蒸馏水溶解备用，用不完的试剂仍 4℃保存；
试剂二	液体 μL×1 支	-20℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部，再加 0.85mL 蒸馏水混匀，分装后于-20℃保存；
试剂三	液体 1.5mL×1 支	4℃保存	
试剂四	液体 35mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加 2mL 蒸馏水溶解即标准品浓度为 100μmol/mL；再用蒸馏水稀释 50 倍成 2μmol/mL 备用检测。

三、所需仪器和用品：

紫外分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、可调式移液器、离心机、水浴锅、蒸馏水。

四、β-羟丁酸含量检测：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

- ① 液体样品：澄清的液体样本可直接检测。若浑浊可离心后取上清液测定。
- ② 组织样本：0.1g 组织（水分充足样本建议取 0.2g 左右），加 1mL 生理盐水或磷酸缓冲液研磨，粗提液全部转移到 EP 管中，12000rpm，常温离心 10min，上清液待测。
- ③ 细菌/细胞样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 生理盐水或磷酸缓冲液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm，常温离心 10min，上清液待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000:1 的比例进行提取。

2、上机检测：

- ① 紫外分光光度计预热 30min，设定波长到 450nm，蒸馏水调零。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃），或置于 25℃水浴中孵育 15min 左右。
- ③ 测定管：试剂一和二和三和四可按照 30:30:30:600 比例混成混合液（一枪加 690μL）（该混合液用多少配多少，现配现用）；对照管：试剂一和三和四可按照 30:30:630 比例混成混合液（一枪加 690μL）（该混合液用多少配多少，现配现用）；

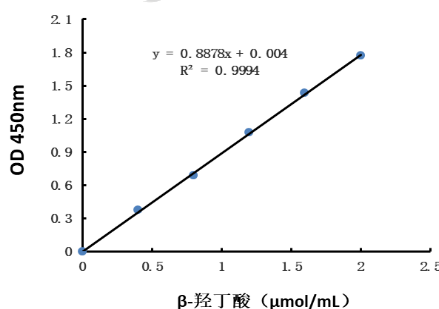
④ 在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂名称（ μL ）	测定管	对照管	空白管（仅测一次）
试剂一	30	30	30
试剂二	30		30
试剂三	30	30	30
试剂四	600	630	600
样本	40	40	
蒸馏水			40

混匀，37°C 孵育 10min 后，于 450nm 处读取各管吸光度 A。
 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个测定管做一个自身对照）。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.8878x + 0.004$ ；x 为标准品浓度（ $\mu\text{mol/mL}$ ），y 为吸光值 ΔA 。



2、按照体积计算：

$$\beta\text{-羟丁酸含量}(\text{mmol/L}) = (\Delta A - 0.004) \div 0.8878 \times V_{\text{标}} \div V_1 \times D = 1.13 \times (\Delta A - 0.004) \times D$$

3、按照组织质量计算：

$$\begin{aligned} \beta\text{-羟丁酸含量}(\mu\text{mol/g 重量}) &= (\Delta A - 0.004) \div 0.8878 \times V_{\text{标}} \div (W \times V_1 \div V) \times D \\ &= 1.13 \times (\Delta A - 0.004) \div W \times D \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \beta\text{-羟丁酸含量}(\text{nmol}/10^4\text{cell}) &= (\Delta A - 0.004) \div 0.8878 \times V_{\text{标}} \times 10^3 \div (500 \times V_1 \div V) \times D \\ &= 1126.4 \times (\Delta A - 0.004) \div 500 \times D \end{aligned}$$

$V_{\text{标}}$ ---做标曲时标准品加样体积，0.04mL； V_1 ---液体样本加体积，0.04mL；

$\mu\text{mol/mL}$ ---即是 mmol/L；

V ---加入提取液体积，1mL；

500---细胞数量，万；

D ---稀释倍数，未稀释即为 1；

W ---样本鲜重，g。

附：标准曲线制作过程：

1 制备标准品母液（100 $\mu\text{mol/mL}$ ）。

2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2. $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。

3 依据测定管的加样顺序操作，依据结果制作标准曲线。