



β-羟丁酸/β-羟基丁酸含量检测试剂盒（WST-8法显色）

微板法

货号: R45418-48S

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有特征吸收峰的黄色物质，通过检测该黄色物质于450nm处的增加量，即可计算得出样本中β-羟丁酸含量。

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1.1mL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0.5mL蒸馏水混匀，分装后于-20℃保存；
试剂三	液体1mL×1支	4℃保存	
试剂四	液体18mL×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。

所需仪器和用品:

酶标仪、96孔板、可调式移液器、离心机、水浴锅、蒸馏水。

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。若溶液有浑浊可离心后进行测定。

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(10^4):提取液 (mL) 为500~1000:1的比例进行提取。

2、上机检测:

①酶标仪预热30min, 设定波长到450nm。

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10:10:10:170比例混成混合液(一枪加200 μ L) (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10:10:180比例混成混合液(一枪加200 μ L) (该混合液用多少配多少, 现配现用);

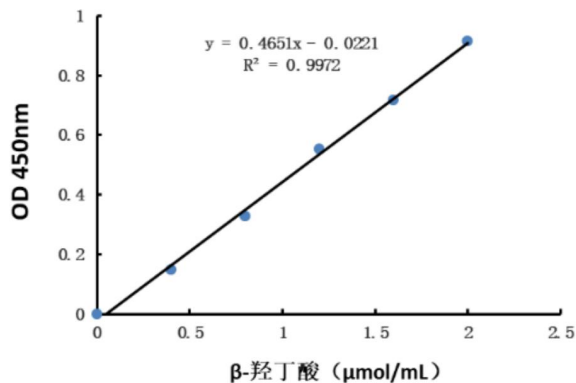
④在96孔板中依次加入:

试剂名称(μ L)	测定管	对照管	空白管(仅测一次)
试剂一	10	10	10
试剂二	10		10
试剂三	10	10	10
试剂四	170	180	170
样本	10	10	
蒸馏水			10
混匀, 37℃孵育10min后, 于450nm处读取各管吸光度A。△A=A测定-A对照(每个测定管做一个自身对照)。			

结果计算:



1、标准曲线方程: $y=0.4651x-0.0221$; x 为标准品浓度($\mu\text{mol/mL}$), y 为吸光值 ΔA 。



2、按照体积计算:

$$\begin{aligned}\beta\text{-羟丁酸含量}(\text{mmol/L}) &= (\Delta A + 0.0221) \div 0.4651 \times V_{\text{标}} \div V_1 \times D \\ &= 2.15 \times (\Delta A + 0.0221) \times D\end{aligned}$$

3、按照组织质量计算:

$$\begin{aligned}\beta\text{-羟丁酸含量}(\mu\text{mol/g 重量}) &= (\Delta A + 0.0221) \div 0.4651 \times V_{\text{标}} \div (W \times V_1 \div V) \times D \\ &= 2.15 \times (\Delta A + 0.0221) \div W \times D\end{aligned}$$

4、按细胞数量计算:

$$\begin{aligned}\beta\text{-羟丁酸含量}(\text{nmol}/10^4\text{cell}) &= (\Delta A + 0.0221) \div 0.4651 \times V_{\text{标}} \times 10^3 \div (500 \times V_1 \div V) \times D \\ &= 2150 \times (\Delta A + 0.0221) \div 500 \times D\end{aligned}$$

$V_{\text{标}}$ ---做标曲时标准品加样体积, 0.01mL;

V_1 ---液体样本加体积, 0.01mL;

$\mu\text{mol/mL}$ -- 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:



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 400-666-5481 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: 3008007435@qq.com

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。



源叶