

β -Hydroxybutyrate Content Assay Kit

β -羟丁酸含量（酶比色法）检测试剂盒说明书

货号：G1226F | 方法：可见分光法 | 规格：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。

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 $\times$ 1 支	4 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 保存；
试剂二	液体 μ L $\times$ 1 支	-20 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 保存；
试剂三	液体 1.5mL $\times$ 1 支	4 $^{\circ}$ C 保存	
试剂四	液体 35mL $\times$ 1 瓶	4 $^{\circ}$ C 保存	
标准品	粉体 mg $\times$ 1 支	4 $^{\circ}$ C 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 100 μ mol/mL；再用蒸馏水稀释 50 倍成 2 μ mol/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（ 10^4 ）：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 $^{\circ}$ C），或置于 25 $^{\circ}$ C 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 690 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 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：

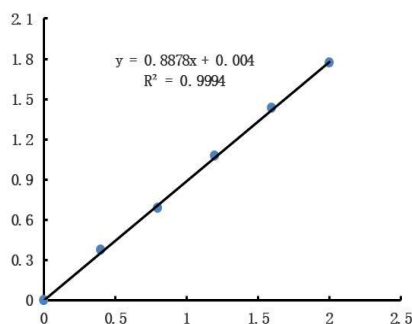
试剂名称（μL）	测定管	对照管	空白管（仅测一次）
试剂一	30	30	30
试剂二	30		30
试剂三	30	30	30
试剂四	600	630	600
样本	40	40	
蒸馏水			40

混匀，37℃孵育 10min 后，于 450nm 处读取各管吸光度 A。
ΔA=A 测定-A 对照（每个测定管做一个自身对照）。

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；
针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算：

1、标准曲线方程：y=0.8878x + 0.004；x 为标准品浓度（μmol/mL），y 为吸光值 ΔA。



标准曲线示意图

说明：标准曲线由标准品测定获得，具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

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_标---做标曲时标准品加样体积，0.04mL； V₁---液体样本加体积，0.04mL；
μmol/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。