

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S1110

Size: 100T/48S

β-羟丁酸含量检测试剂盒说明书

酶比色法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定原理:

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，通过检测 NADH 在 340nm 处的增加量，即可计算得出样本中 β-羟丁酸含量。

二、需自备的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、离心机、水浴锅、蒸馏水。

三、试剂的组成和配置:

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 0.6mL 蒸馏水溶解备用，用不完的试剂仍 4℃ 保存；
试剂二	液体 9mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂三	液体 μL×1 支	-20℃ 保存	临用前甩几下使试剂落入底部，再加 0.55mL 蒸馏水混匀，分装后于-20℃ 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 100mmol/L；再用蒸馏水稀释 20 倍成 5mmol/L 备用检测。

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！

五、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：

称取 0.1g 组织（水分充足的样本建议取 0.2g 左右），加 1mL 的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。

六、上机检测：

① 酶标仪预热 30min，设定波长到 340nm。

② 所有试剂解冻至室温（25℃），或置于 25℃ 水浴中孵育 15min 左右。

③ 试剂一和二可按照 10:170 比例混成混合液（一枪加 180 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	标准管（仅测一次）	空白管（仅测一次）
样本	10		
标准品		10	
蒸馏水			10
试剂一	10	10	10

试剂二	170	170	170
混匀，37℃孵育 5min 后，于 340nm 处读取各管吸光度 A1。			
试剂三	10	10	10
混匀，37℃孵育 10min 后，于 340nm 处读取各管吸光度 A2。ΔA=A2-A1。			

【注】1. 若 ΔA 值小于 0.01，可增加样本取样量 V1（如增至 50 μL，则试剂二相应减少，总体积不变），则改变后的 V1 需代入公式重新计算。

2. 若 ΔA 大于 0.6，可降低样本取样量 V1（如降至 5 μL，则试剂二相应增加，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。

七、结果计算：

1、按照体积计算：

$$\beta\text{-羟丁酸}(\text{mmol/L}) = (\text{C 标准} \times \text{V 标}) \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \div V1 \times D = 5 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \times D$$

2、按照组织质量计算：

$$\beta\text{-羟丁酸}(\mu\text{mol/g 重量}) = (\text{C 标准} \times \text{V 标}) \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \div (W \times V1 \div V) \times D = 5 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \div W \times D$$

3、按照蛋白浓度计算：

$$\beta\text{-羟丁酸}(\mu\text{mol/mg prot}) = (\text{C 标准} \times \text{V 标}) \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\text{Cpr} \times V1) \times D = 5 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \div \text{Cpr} \times D$$

4、按细胞数量计算：

$$\beta\text{-羟丁酸}(\text{nmol}/10^4\text{cell}) = (\text{C 标准} \times \text{V 标}) \times 10^3 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \div (500 \times V1 \div V) \times D = 5000 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \div 500 \times D$$

C 标准 --- 标品浓度, 5mmol/L=5 μ mol/mL;	V 标---标准品取样体积, 0.01mL;
V1---取样体积, 0.01mL;	V---加入提取液体积, 1mL;
W---样本鲜重, g;	500---细胞数量, 万;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒 (ZC-S0470)。