

β-羟丁酸含量（酶比色法）检测试剂盒说明书

（货号：G1225F 分光法 48 样）

一、产品简介：

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、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°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°C 保存； |
| 试剂二 | 液体 30mL×1 瓶 | 4°C 保存 | |
| 试剂三 | 液体 μL×1 支 | -20°C 保存 | 临用前甩几下使试剂落入底部，再加 1.5mL 蒸馏水混匀，分装后于 -20°C 保存； |
| 标准品 | 粉体 mg×1 支 | 4°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 mmol/L；再用蒸馏水稀释 20 倍成 5mmol/L 备用检测。 |

三、所需仪器和用品：

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿（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：

称取 0.1g 样本（水分充足的样本建议取 0.2g 左右），加 1mL 生理盐水或者磷酸缓冲液研磨，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 340nm，蒸馏水调零。

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

③ 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

| 试剂名称 (μL) | 测定管 | 标准管 (仅测一次) | 空白管 (仅测一次) |
|--|-----|------------|------------|
| 样本 | 40 | | |
| 标准品 | | 40 | |
| 蒸馏水 | | | 40 |
| 试剂一 | 30 | 30 | 30 |
| 试剂二 | 600 | 600 | 600 |
| 混匀, 37°C 孵育 5min 后, 于 340nm 处读取各管吸光度 A1。 | | | |
| 试剂三 | 30 | 30 | 30 |
| 混匀, 37°C 孵育 10min 后, 于 340nm 处读取各管吸光度 A2。ΔA=A2-A1。 | | | |

【注】若 ΔA 值小于 0.01, 可增加样本取样量 V1 (如增至 80μL, 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。

五、结果计算:

1、按照体积计算:

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

$$= 5 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白})$$

2、按照组织质量计算:

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

$$= 5 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \div \text{W}$$

3、按照蛋白浓度计算:

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

$$= 5 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \div \text{Cpr}$$

4、按细胞数量计算:

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

$$\div (500 \times \text{V1} \div \text{V})$$

$$= 5000 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \div 500$$

C 标准---标品浓度, 5mmol/L=5μmol/mL; V 标---标准品取样体积, 0.04mL;
 V1---取样体积, 0.04mL; V---加入提取液体积, 1mL;
 W---样本鲜重, g; 500---细胞数量, 万;
 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。