

β-羟丁酸含量（WST-8 法显色）检测试剂盒说明书

（货号：ADS-W-D016 微板法 48 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	粉体 1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4℃离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加 1.1mL 蒸馏水充分溶解备用，用不完的试剂仍 4℃保存（保存周期与试剂盒有效期相同）；
试剂二	液体 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4℃离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加 0.5mL 蒸馏水混匀，用不完的试剂分装后 -20℃保存（保存周期与试剂盒有效期相同）；
试剂三	粉体×1 支	4℃避光保存	1. 临用前 8000g 4℃离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加 1mL 蒸馏水充分溶解备用，用不完的试剂仍 4℃保存（保存周期与试剂盒有效期相同）；
试剂四	液体 18mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉体 1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4℃离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加 2mL 蒸馏水溶解即标准品浓度为 100μmol/mL； 3. 用蒸馏水稀释 50 倍，即 2μmol/mL 备用检测。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

① 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。

② 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。

③ 细菌/培养细胞：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞至 EP 管中，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆(可使用各类常见电动匀浆器)，12,000rpm 4℃ 离心 10min，取上清待测。

2、检测步骤：

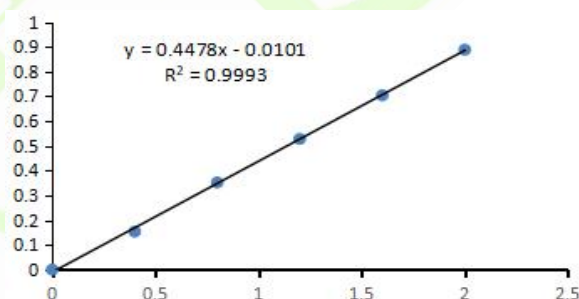
- ① 打开酶标仪，设置温度 25℃（若仪器无法控温，则等待仪器过自检程序即可），调节波长到 450nm。
- ② 所有试剂解冻至室温，试剂一和二和三可按照 10:10:10 比例混成混合液直接加 30μL 即可（需注意对照管不加试剂二，所以试剂一和二和三不要一次性混合完），在 96 孔板中按下表依次加入：

试剂组分 (μL)	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。 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个测定管做一个自身对照）。			

- 【注】1. 若 ΔA 值小于 0.01，可增加样本取样量 V_1 （如增至 30μL，则试剂三相应减少，总体积不变），则改变后的 V_1 需代入公式重新计算。
2. 若 A 测定管值大于 1.2，可降低样本取样量 V_1 （如降至 5μL，则试剂三相应增加，总体积不变），则改变后的 V_1 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

- 1、标准曲线方程： $y = 0.4478x - 0.0101$ ；x 为标准品浓度 (μmol/mL)，y 为吸光值 ΔA 。



- 1、按照组织质量计算：

$$\begin{aligned} \beta\text{-羟丁酸含量}(\text{mmol/g 重量}) &= (\Delta A + 0.0101) \div 0.4478 \times V_{\text{标}} \div (W \times V_1 \div V) \\ &= 2.23 \times (\Delta A + 0.0101) \div W \end{aligned}$$

- 2、按蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \beta\text{-羟丁酸含量}(\text{mmol/mg prot}) &= (\Delta A + 0.0101) \div 0.4478 \times V_{\text{标}} \div (C_{\text{pr}} \times V_1 \div V) \\ &= 2.23 \times (\Delta A + 0.0101) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

- 3、按照体积计算：

$$\begin{aligned} \beta\text{-羟丁酸含量}(\text{mmol/L}) &= (\Delta A + 0.0101) \div 0.4478 \times V_{\text{标}} \div V_1 \\ &= 2.23 \times (\Delta A + 0.0101) \end{aligned}$$

- 4、按细菌/细胞密度计算：

$$\begin{aligned} \beta\text{-羟丁酸含量}(\text{mmol}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A + 0.0101) \div 0.4478 \times V_{\text{标}} \div (500 \times V_1 \div V) \\ &= 0.0045 \times (\Delta A + 0.0101) \end{aligned}$$

V 标---做标曲时标准品加样体积, 0.01mL; V1---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;
 W---样本鲜重, g。 500---细菌/细胞数量, 万;
 Cpr---上清液蛋白浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 标曲为非必做实验, 用户可根据实验需求制作标曲, 也可直接采用说明书计算公式进行结果计算。
- 2 标准品母液浓度为 $100\mu\text{mol/mL}$ 。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, $2\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 3 标品稀释参照表如下:

吸取标准品母液 100uL, 加入 4.9mL 蒸馏水, 混匀得到 $2\mu\text{mol/mL}$ 的标品稀释液待用。						
标品浓度 $\mu\text{mol/mL}$	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 4 依据测定管的加样表操作, 根据结果, 以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值, 过 0 点制作标准曲线。
 在 96 孔板中按下表依次加入:

试剂组分 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
试剂一	10	10
试剂二	10	10
试剂三	10	10
试剂四	170	170
标准品	10	
蒸馏水		10
混匀, 37°C 孵育 10min 后, 于 450nm 处读取各管吸光度 A, $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度。		