

β-羟丁酸含量（酶比色法）检测试剂盒说明书

（货号：ADS-W-D015-48 微板法 48 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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 0.6mL 蒸馏水溶解备用，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 9mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉体 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4℃离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加 0.55mL 蒸馏水混匀，分装后于-20℃保存（保存周期与试剂盒有效期相同）；
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 100 mmol/L；再用蒸馏水稀释 5 倍（100μl 标品母液+400μl 蒸馏水）成 20mmol/L 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 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。

② 液体样品：澄清的液体样本可直接检测。

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 500 万细菌或细胞加入 1mL 生理盐水或者磷酸缓冲液，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 酶标仪预热 30min（等待仪器过自检程序亦可），设定波长到 340nm。
- ② 所有试剂解冻至室温，在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (μL)	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】若 ΔA 值小于 0.01，可增加样本取样量 V1（如增至 50μL，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、按照组织质量计算：

$$\beta\text{-羟丁酸}(\text{mmol/g 重量}) = (C \text{ 标准} \times V \text{ 标}) \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \div (W \times V1 \div V) \\ = 20 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \div W$$

2、按照蛋白浓度计算：

$$\beta\text{-羟丁酸}(\text{mmol/mg prot}) = (C \text{ 标准} \times V \text{ 标}) \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \div (Cpr \times V1 \div V) \\ = 20 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \div Cpr$$

3、按照体积计算：

$$\beta\text{-羟丁酸}(\text{mmol/L}) = (C \text{ 标准} \times V \text{ 标}) \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \div V1 \\ = 20 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白})$$

4、按细菌/细胞密度计算：

$$\beta\text{-羟丁酸}(\text{mmol}/10^4 \text{ cell}) = (C \text{ 标准} \times V \text{ 标}) \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \div (Cpr \times V1 \div V) \\ = 20 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \div Cpr$$

C 标准---标品浓度，20mmol/L； 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---细菌或细胞总数，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。