

β-羟丁酸含量（WST-8 法显色）检测试剂盒说明书

（货号：ADS-F-D016 分光法 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 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	粉体 1 支	-20°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°C保存；
试剂三	粉体×1 支	4°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加 1.5ml 蒸馏水溶解备用，用不完的试剂仍 4°C保存。
试剂四	液体 35mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉体 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 100μmol/mL；再用蒸馏水稀释 50 倍成 2μmol/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、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 液体样品：澄清的液体样本可直接检测。
- 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。

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，试剂一和二和三可按照 30:30:30 比例混成混合液直接加 90μL 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 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°C 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. 若可增加样本取样量，则试剂三相应减少，

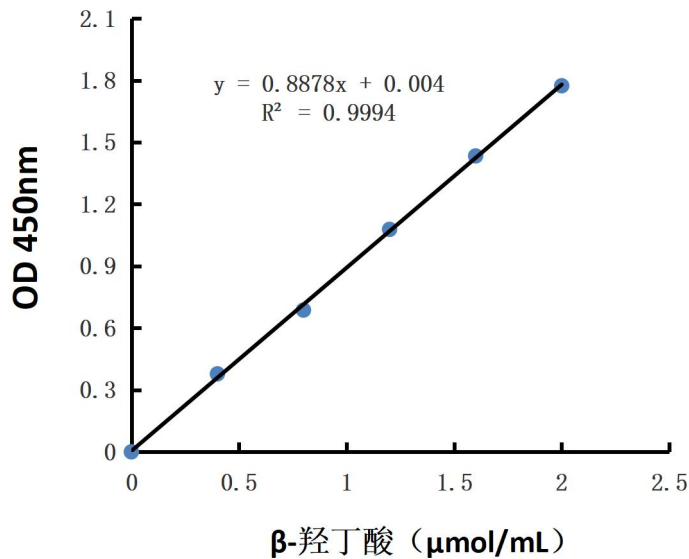
ΔA 值小于 0.01， V_1 （如增至 80 μL ，

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 10 μL ，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： $y = 0.8878x + 0.004$ ；x 为标准品浓度（ $\mu\text{mol/mL}$ ），y 为吸光值 ΔA 。



2、按照体积计算：

$$\beta\text{-羟丁酸含量}(\text{mmol/L}) = (\Delta A - 0.004) \div 0.8878 \times V_{\text{标}} \div V_1 = 1.13 \times (\Delta A - 0.004)$$

3、按照组织质量计算：

$$\begin{aligned} \beta\text{-羟丁酸含量}(\text{mmol/g 重量}) &= (\Delta A - 0.004) \div 0.4651 \times V_{\text{标}} \div (W \times V_1 \div V) \\ &= 1.13 \times (\Delta A - 0.004) \div W \end{aligned}$$

$V_{\text{标}}$ ---做标曲时标准品加样体积，0.04mL； V_1 ---液体样本加体积，0.04mL；
 $\mu\text{mol/mL}$ ---即是 mmol/L。 V ---加入提取液体积，1mL；
 W ---样本鲜重，g。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（100 $\mu\text{mol/mL}$ ）。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2. $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样顺序操作，依据结果制作标准曲线。

