β-羟丁酸含量（酶比色法）检测试剂盒说明书

（货号：ADS-W-D016　微板法 48 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 1 支	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用，用不完的试剂仍 4℃保存；
试剂二	粉体 1 支	-20℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部，再加 0.5mL 蒸馏水混匀，分装后于-20℃保存；
试剂三	粉体×1 支	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加 1ml 蒸馏水溶解备用，用不完的试剂仍 4℃保存。
试剂四	液体 18mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉体 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 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：

酶标仪、96 孔板、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、**样本制备：**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。

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 酶标仪预热 30min，设定波长到 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	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

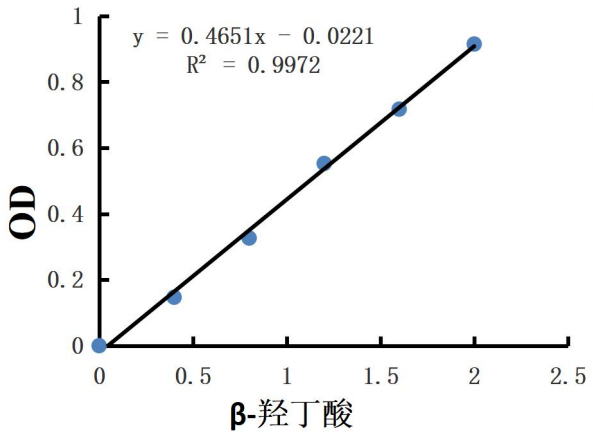
混匀，37℃孵育 10min 后，于 450nm 处读取各管吸光度 A。ΔA=A 测定-A 对照（每个测定管做一个自身对照）。

【注】1. 若ΔA 值小于 0.01，可增加样本取样量 V1（如增至 30μL，则试剂三相应减少，总体积不变），则改变后的 V1 需代入公式重新计算。

2. 若 A 测定管值大于 1.2，可降低样本取样量 V1（如降至 5μL，则试剂三相应增加，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、标准曲线方程：y = 0.4651x - 0.0221；x 为标准品浓度（μmoL/mL），y 为吸光值△A。



2、按照体积计算：

β-羟丁酸含量(mmol/L)=(△A+0.0221)÷0.4651×V 标÷V1=2.15×(△A+0.0221)

3、按照组织质量计算：

β-羟丁酸含量(mmol/g 重量)=(△A+0.0221)÷0.4651×V 标÷(W×V1÷V)

=2.15×(△A+0.0221)÷W

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；

μmoL/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（100μmol/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. μmol/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。