

β-羟丁酸含量（酶比色法）检测试剂盒说明书

（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℃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℃保存；
试剂二	液体 μL×1 支	-20℃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℃保存；
试剂三	液体 1.5mL×1 支	4℃保存	
试剂四	液体 35mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉体 mg×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：

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、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：

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。

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 450nm，蒸馏水调零。

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

③ 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：

【
ΔA 值小
增加样本
(如增至
试剂三相

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。
ΔA=A 测定-A 对照 (每个测定管做一个自身对照)。

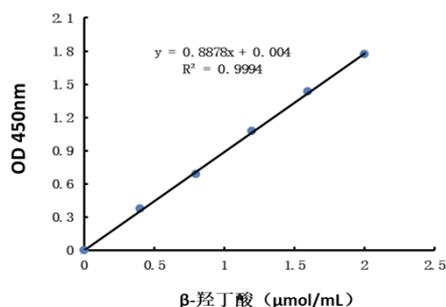
注】1. 若
于 0.01, 可
取样本 V1
80μL, 则
应减少,
总体积
不变), 则
改变后的
V1 需代入

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 10μL, 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： $y=0.8878x+0.004$ ；x 为标准品浓度 (μmol/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：

$$\begin{aligned}\beta\text{-羟丁酸含量}(\mu\text{mol/g 重量})&=(\Delta A-0.004)\div 0.8878\times V_{\text{标}}\div (W\times V_1\div V) \\ &=1.13\times(\Delta A-0.004)\div W\end{aligned}$$

- 4、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned}\beta\text{-羟丁酸含量}(\text{nmol}/10^4\text{cell})&=(\Delta A-0.004)\div 0.8878\times V_{\text{标}}\times 10^3\div (500\times V_1\div V) \\ &=1126.4\times(\Delta A-0.004)\div 500\end{aligned}$$

V 标---做标曲时标准品加样体积，0.04mL； V1---液体样本加体积，0.04mL；

μmol/mL---即是 mmol/L。

V---加入提取液体积，1mL；

500---细胞数量，万；

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。