

## 酮体含量检测试剂盒（血清、血浆、尿液等）说明书

微量法

货号：AC10785

规格：100T/96S

**产品内容：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。**

试剂名称	规格	保存条件
试剂一 A 液	液体 20mL×1 瓶	4°C保存
试剂一 B 液	液体 20mL×1 瓶	4°C保存
试剂二 A 液	粉剂×2 支	-20°C保存
试剂二 B 液	粉剂×2 支	-20°C保存
试剂三	粉剂×2 支	-20°C保存
标准品 1	粉剂×1 支	4°C保存
标准品 2	粉剂×1 支	-20°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂二 A 液：临用前取一支加入 600 $\mu$ L 蒸馏水，充分溶解。用不完的试剂分装后-20°C可保存 3 周。避免反复冻融。
- 2、试剂二 B 液：临用前取一支加入 300 $\mu$ L 蒸馏水，充分溶解。用不完的试剂分装后-20°C可保存 3 周。避免反复冻融。
- 3、试剂三：临用前取一支加入 400 $\mu$ L 蒸馏水（100T/96S），充分溶解。用不完的试剂分装后-20°C保存 3 周。避免反复冻融。
- 4、标准品 1：8mg 3-羟基丁酸钠。临用前加入 0.98mL 蒸馏水，充分溶解，即 8mg/mL 3-羟基丁酸钠标准溶液，4°C可以保存 4 周。临用前根据试验所需量用蒸馏水稀释成 0.2mg/mL 标准溶液待用，即为标准溶液 1。
- 5、标准品 2：8mg 乙酰乙酸锂。临用前加入 0.95mL 蒸馏水，充分溶解，即 8mg/mL 乙酰乙酸锂标准溶液，-20°C可以保存 4 周。临用前根据试验所需量用蒸馏水稀释成 0.05mg/mL 标准溶液待用，即标准溶液 2。
- 6、**BOH 工作液配制**：临用前根据试验所需量将试剂一 A 液、试剂二 A 液、试剂三按照 850 $\mu$ L:40 $\mu$ L:10 $\mu$ L（共 900 $\mu$ L，5T 的量）的比例配成工作液，充分混匀，置于 37°C保温 15min（此步骤不可省略），现用现配，工作液在 4h 内用完。
- 7、**AcAc 工作液配制**：临用前根据试验所需量将试剂一 B 液、试剂二 B 液、试剂三按照 870 $\mu$ L:20 $\mu$ L:10 $\mu$ L（共 900 $\mu$ L，5T 的量）的比例配成工作液，充分混匀，置于 37°C保温 15min（此步骤不可省略），现用现配，工作液在 4h 内用完。

**产品说明：**

酮体是肝脏脂肪酸氧化分解的中间产物乙酰乙酸（AcAc）、 $\beta$ -羟丁酸（BOH）及丙酮三者统称。酮体中丙酮的生成量相当小，生成后即被吸收。乙酰乙酸和  $\beta$ -羟丁酸则经血流进入肝外组织，在那里被氧化，经柠檬酸循环提供更多能量给那些组织使用，例如骨、心肌和肾皮质。

在 pH 7.0 和 37°C 条件下, BOH 在  $\beta$ -羟丁酸脱氢酶 (HBDH) 催化下脱氢生成乙酰乙酸, 同时  $\text{NAD}^+$  被还原成 NADH; 在 pH 8.8 和 37°C 条件下, AcAc 被 HBDH 还原为 3-羟基丁酸酯或脱羧生成丙酮, 同时 NADH 被氧化成  $\text{NAD}^+$ , NADH 在 340nm 波长下有特征吸收峰, 通过检测在 340nm 波长下的吸光值变化可以计算出 BOH 和 AcAc 的含量, 从而计算出样本中酮体的含量。

**注意:** 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

### 需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅/培养箱、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔 UV 板、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

### 操作步骤:

#### 一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

血清 (浆)、尿液等液体样本: 直接测定。(若有浑浊可以离心取上清后测定)

#### 二、测定步骤

1、紫外分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 用蒸馏水调零。

#### 2、BOH 含量测定:

试剂名称 ( $\mu\text{L}$ )	测定管	标准管	空白管
样本	20		
标准溶液 1		20	
蒸馏水			20
BOH 工作液	180	180	180

将上述溶液依次加入微量石英比色皿/96 孔 UV 板中, 充分混匀 20s, 记录 340nm 处 20s 时吸光值  $A_{\text{BOH 样本 1}}$ 、 $A_{\text{BOH 标准 1}}$ 、 $A_{\text{BOH 空白 1}}$ , 37°C 水浴锅或者培养箱反应 5min (酶标仪有控温功能的可以将温度调至 37°C), 反应后拿出迅速擦干测定 5min20s 时吸光值  $A_{\text{BOH 样本 2}}$ 、 $A_{\text{BOH 标准 2}}$ 、 $A_{\text{BOH 空白 2}}$ 。计算  $\Delta A_{\text{BOH 样本}} = A_{\text{BOH 样本 2}} - A_{\text{BOH 样本 1}}$ ,  $\Delta A_{\text{BOH 标准}} = A_{\text{BOH 标准 2}} - A_{\text{BOH 标准 1}}$ ,  $\Delta A_{\text{BOH 空白}} = A_{\text{BOH 空白 2}} - A_{\text{BOH 空白 1}}$ 。  
空白管和标准管只需做 1-2 次。

#### 3、AcAc 含量测定:

试剂名称 ( $\mu\text{L}$ )	测定管	标准管	空白管
样本	20		
标准溶液 2		20	
蒸馏水			20
AcAc 工作液	180	180	180

将上述溶液依次加入微量石英比色皿/96 孔 UV 板中, 充分混匀 20s, 记录 340nm 处 20s 时吸光值  $A_{\text{AcAc 样本 1}}$ 、 $A_{\text{AcAc 标准 1}}$ 、 $A_{\text{AcAc 空白 1}}$ , 37°C 水浴锅或者培养箱反应 5min (酶标仪有控温功能的可以将温度调至 37°C), 反应后拿出迅速擦干测定 5min20s 时吸光值  $A_{\text{AcAc 样本 2}}$ 、 $A_{\text{AcAc 标准 2}}$ 、 $A_{\text{AcAc 空白 2}}$ 。计算  $\Delta A_{\text{AcAc 样本}} = A_{\text{AcAc 样本 1}} - A_{\text{AcAc 样本 2}}$ ,  $\Delta A_{\text{AcAc 标准}} = A_{\text{AcAc 标准 1}} - A_{\text{AcAc 标准 2}}$ ,  $\Delta A_{\text{AcAc 空白}} = A_{\text{AcAc 空白 1}} - A_{\text{AcAc 空白 2}}$ 。  
空白管和标准管只需做 1-2 次。

### 三、酮体含量计算

### 1、BOH 计算公式

$$\begin{aligned} \text{BOH 含量 } (\mu\text{mol/mL}) &= (\Delta A_{\text{BOH 样本}} - \Delta A_{\text{BOH 空白}}) \div (\Delta A_{\text{BOH 标准}} - \Delta A_{\text{BOH 空白}}) \times C_{\text{BOH}} \div 126.09 \times 1000 \\ &= 1.586 \times (\Delta A_{\text{BOH 样本}} - \Delta A_{\text{BOH 空白}}) \div (\Delta A_{\text{BOH 标准}} - \Delta A_{\text{BOH 空白}}) \end{aligned}$$

### 2、AcAc 计算公式

$$\begin{aligned} \text{AcAc 含量 } (\mu\text{mol/mL}) &= (\Delta A_{\text{AcAc 样本}} - \Delta A_{\text{AcAc 空白}}) \div (\Delta A_{\text{AcAc 标准}} - \Delta A_{\text{AcAc 空白}}) \times C_{\text{AcAc}} \div 108.02 \times 1000 \\ &= 0.463 \times (\Delta A_{\text{AcAc 样本}} - \Delta A_{\text{AcAc 空白}}) \div (\Delta A_{\text{AcAc 标准}} - \Delta A_{\text{AcAc 空白}}) \end{aligned}$$

### 3、酮体计算公式

$$\text{酮体含量 } (\mu\text{mol/mL}) = \text{BOH 含量} + \text{AcAc 含量}$$

$C_{\text{BOH}}$ : BOH 标准溶液 1 浓度, 0.2mg/mL;  $C_{\text{AcAc}}$ : AcAc 标准溶液 2 浓度, 0.05mg/mL; 126.09: 3-羟基丁酸钠的分子量, 126.09mg/mmol; 108.02: 乙酰乙酸锂的分子量, 126.09mg/mmol; 1000: 单位换算系数, 1mmol=1000 $\mu$ mol。

### 注意事项:

1. 如果测定初始吸光值 > 1.5 或  $\Delta A > 0.2$ , 建议将样本用蒸馏水稀释后再测定。计算公式中乘上稀释倍数;
2. 如果  $\Delta A$  接近空白值, 建议加大样本量, 同时保证反应体系总体积不变, 相应减少工作液加样量后测定。例如, 若增大样本量为 40 $\mu$ L, 则工作液调整为 160 $\mu$ L。标准管与样本管加样体系应保持一致, 计算公式不变。

### 实验实例:

取 20 $\mu$ L 牛血清按上述步骤进行实验, 用微量石英比色皿测定后进行计算  $\Delta A_{\text{BOH 样本}} = A_{\text{BOH 样本 } 2} - A_{\text{BOH 样本 } 1} = 0.1116 - 0.0701 = 0.0415$ ,  $\Delta A_{\text{BOH 标准}} = A_{\text{BOH 标准 } 2} - A_{\text{BOH 标准 } 1} = 0.2237 - 0.0277 = 0.1960$ ,  $\Delta A_{\text{BOH 空白}} = A_{\text{BOH 空白 } 2} - A_{\text{BOH 空白 } 1} = 0.0173 - 0.0169 = 0.0004$ ,  $\Delta A_{\text{AcAc 样本}} = A_{\text{AcAc 样本 } 1} - A_{\text{AcAc 样本 } 2} = 0.8727 - 0.8646 = 0.0081$ ,  $\Delta A_{\text{AcAc 标准}} = A_{\text{AcAc 标准 } 1} - A_{\text{AcAc 标准 } 2} = 0.9747 - 0.8137 = 0.161$ ,  $\Delta A_{\text{AcAc 空白}} = A_{\text{AcAc 空白 } 1} - A_{\text{AcAc 空白 } 2} = 0.6698 - 0.665 = 0.0048$ 。计算

$$\text{BOH 含量 } (\mu\text{mol/mL}) = (\Delta A_{\text{BOH 样本}} - \Delta A_{\text{BOH 空白}}) \div (\Delta A_{\text{BOH 标准}} - \Delta A_{\text{BOH 空白}}) \times C_{\text{BOH}} = 0.333 \mu\text{mol/mL}$$

$$\text{AcAc 含量 } (\mu\text{mol/mL}) = (\Delta A_{\text{AcAc 样本}} - \Delta A_{\text{AcAc 空白}}) \div (\Delta A_{\text{AcAc 标准}} - \Delta A_{\text{AcAc 空白}}) \times C_{\text{AcAc}} = 0.0098 \mu\text{mol/mL}$$

$$\text{酮体含量 } (\mu\text{mol/mL}) = \text{BOH 含量} + \text{AcAc 含量} = 0.343 \mu\text{mol/mL}。$$