

乙酰乙酸 (AcAc) 含量检测试剂盒 (WST 法) 说明书

可见分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC5070

规格：50T/24S

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 30 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 70 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂三	粉剂×3 支	-20℃保存
显色液	液体 4 mL×1 瓶	-20℃保存
标准品	粉剂×1 支	-20℃保存

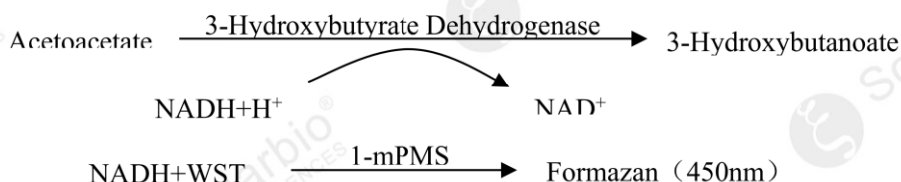
溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 3mL 蒸馏水，充分溶解。用不完的试剂分装后-20℃可保存 4 周。避免反复冻融。
- 2、试剂三：临用前取一支加入 400μL 蒸馏水（约 20S），充分溶解。用不完的试剂分装后-20℃保存，可以保存 2 周。避免反复冻融。（该试剂为冻干试剂，可能存在不同瓶间肉眼观察试剂量相差较大甚至量很少的现象，此现象不影响使用，实际质量相同。）
- 3、标准品：乙酰乙酸锂。临用前加入 950μL 蒸馏水，充分溶解，即 8mg/mL 乙酰乙酸锂标准品。-20℃分装保存 4 周。避免反复冻融。
- 4、工作液配制：临用前根据实验所需量将试剂一、试剂二、试剂三按照 840μL:40μL:20μL（共 900μL，约 1S 的量）的比例配成工作液，充分混匀，置于 37℃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：

乙酰乙酸 (AcAc) 是酮体的重要成分之一，约占正常人酮体总量 20%，是脂肪酸通过氧化产生的，是一种较强的有机酸。正常含量的乙酰乙酸对人体无害，糖尿病患者由于糖的利用降低，或饥饿时由于糖的代谢障碍，大量动用脂肪，乙酰乙酸的量都会积累。乙酰乙酸既可转化成丙酮，也可以转化成 β-羟丁酸。

AcAc 在 β-羟丁酸脱氢酶催化下发生反应，同时 NADH 被氧化成 NAD⁺；在 1-mPMS 作用下，WST-1 与 NADH 反应产生水溶性 formazan，在 450nm 下有特征吸收峰。检测 450nm 下吸光值的减少，计算出 AcAc 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:

可见分光光度计、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵/匀浆器/超声波细胞破碎仪、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）

1、组织样本：按照质量（g）：提取液体积（mL）为 1:5~10 的比例（建议称取约 0.1 g 组织，加入 1mL 提取液）加入提取液，冰浴匀浆后于 4℃，12000 g 离心 10 min，取上清，置冰上待测。

2、细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为 500~1000:1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液），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）；12000 g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

3、血清（浆）：直接测定，若样本浑浊可离心后取上清使用。

二、测定步骤

1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 450nm，蒸馏水调零。

2、标准品配制：将 8mg/mL 乙酰乙酸锂标准品，用蒸馏水稀释 0.3、0.2、0.16、0.12、0.08mg/mL 标准品待用。

3、标准品稀释可参考下表：

序号	稀释前浓度（mg/mL）	标准品体积（μL）	蒸馏水体积（μL）	稀释后浓度（μmol/mL）
1	8	36	924	0.3
2	0.3	600	300	0.2
3	0.2	600	150	0.16
4	0.16	450	150	0.12
5	0.12	300	150	0.08

备注：下述实验中每个标准管需 100μL 标准品（注意不要在此步骤直接检测吸光度）。

4、按下表步骤加样：

试剂名称（μL）	测定管	对照管	空白管	标准管
样本	100	100	-	-
蒸馏水	-	-	100	-
标准品	-	-	-	100
工作液	900	-	900	900
试剂一	-	900	-	-
37℃条件下反应 10 min				
显色液	50	50	50	50
37℃条件下避光反应 20 min				
于 450 nm 处测定吸光度。分别记为 A 测定、A 对照、A 空白、A 标准。 ΔA 测定=A 空白-（A 测定-A 对照）， ΔA 标准=A 空白-A 标准。空白管和标准管只需做 1-2 次。				

三、AcAc 含量计算

1、标准曲线绘制：以乙酰乙酸锂标准品浓度为横坐标（x，mg/mL），以 ΔA 标准为纵坐标（y）绘制标准曲线，得到线性回归方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 测定带入方程求得 x（mg/mL）。



2、计算公式

(1) 按照蛋白浓度计算

$$\text{AcAc 含量} (\mu\text{mol/mg prot}) = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div 108.02 \times 1000 \times F = 9.258x \div C_{\text{pr}} \times F$$

(2) 按照样本质量计算

$$\text{AcAc 含量} (\mu\text{mol/g 质量}) = x \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 108.02 \times 1000 \times F = 9.258x \div W \times F$$

(3) 按照细胞或细菌数量计算

$$\text{AcAc 含量} (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = x \times V_{\text{样}} \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 108.02 \times 1000 \times F = 9.258x \div N \times F$$

(4) 按照血清(浆)体积计算

$$\text{AcAc 含量} (\mu\text{mol/mL}) = x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div 108.02 \times 1000 \times F = 9.258x \div F$$

V 样: 反应中加入样本体积, 100 μL = 0.1 mL; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; N: 细胞或细菌总数, 以 10^4 计; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; 108.02: 乙酰乙酸锂分子量, mg/mmol; 1000: 单位换算系数, 1mmol=1000 μmol 。

注意事项:

1. 显色完成后, 请在 15min 之内完成检测。
2. 如果样本 ΔA 测定低于线性范围吸光值, 可以增加样本量后再进行测定; 如果样本 ΔA 测定高于线性范围吸光值, 可以将样本用提取液稀释后再进行测定。空白管和标准管需同时做相应调整。

实验实例:

1. 取 0.1025g 大鼠肝脏加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆, 上清用提取液稀释 4 倍后, 按照测定步骤操作, 使用 1mL 玻璃比色皿测得 ΔA 测定 = A 空白 - (A 测定 - A 对照) = 1.003 - (0.907 - 0.109) = 0.205, 根据标准曲线 $y = 2.6588x - 0.1413$, $R^2 = 0.994$, 计算 $x = 0.130$, 按样本质量计算含量得:
 $\text{AcAc 含量} (\mu\text{mol/g 质量}) = 9.258x \div W \times F = 46.967 \mu\text{mol/g 质量}$ 。
2. 取 0.1047g 小鼠肝脏加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆, 上清用提取液稀释 2 倍后, 按照测定步骤操作, 使用 1mL 玻璃比色皿测得 ΔA 测定 = A 空白 - (A 测定 - A 对照) = 1.003 - (0.821 - 0.214) = 0.396, 根据标准曲线 $y = 2.6588x - 0.1413$, $R^2 = 0.994$, 计算 $x = 0.202$, 按样本质量计算含量得:
 $\text{AcAc 含量} (\mu\text{mol/g 质量}) = 9.258x \div W \times F = 35.723 \mu\text{mol/g 质量}$ 。
3. 取 100 μL 牛血清样本, 直接按照测定步骤操作, 使用 1mL 玻璃比色皿测得 ΔA 测定 = A 空白 - (A 测定 - A 对照) = 1.003 - (0.808 - 0.128) = 0.323, 根据标准曲线 $y = 2.6588x - 0.1413$, $R^2 = 0.994$, 计算 $x = 0.175$, 按血清(浆)等液体体积计算含量得:
 $\text{AcAc 含量} (\mu\text{mol/mL}) = 9.258x \div F = 1.620 \mu\text{mol/mL}$ 。

相关系列产品:

- BC5080/BC5085 β -羟丁酸 (β -HB) 含量检测试剂盒 (WST 法)
BC1980/BC1985 总胆固醇 (TC) 含量检测试剂盒
BC1890/BC1895 游离胆固醇 (FC) 含量检测试剂盒

