

酮体含量检测试剂盒（血清、血浆、尿液等）说明书

微量法

货号：BC5065

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一 A 液	液体 20mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一 B 液	液体 20mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二 A 液	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂二 B 液	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂三	粉剂×2 支	-20℃保存
标准品 1	粉剂×1 支	2-8℃保存
标准品 2	粉剂×1 支	-20℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂二 A 液：临用前取一支加入 600μL 蒸馏水，充分溶解。用不完的试剂分装后-20℃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 300μL 蒸馏水，充分溶解。用不完的试剂分装后-20℃可保存 3 周。避免反复冻融。
- 3、试剂三：临用前取一支加入 400μL 蒸馏水（100T/96S），充分溶解。用不完的试剂分装后-20℃保存 3 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）。
- 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，2-8℃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℃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 850μL:40μL:10μL（共 900μL，5T 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。
- 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 870μL:20μL:10μL（共 900μL，5T 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：

酮体是肝脏脂肪酸氧化分解的中间产物乙酰乙酸（AcAc）、β-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 β-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 8.8 和 37°C 条件下, BOH 在 β -羟丁酸脱氢酶 (HBDH) 催化下脱氢生成乙酰乙酸, 同时 NAD^+ 被还原成 NADH; 在 pH 7.0 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 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。

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 (μL)	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_{BOH} 样本 1、 A_{BOH} 标准 1、 A_{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_{BOH} 样本 2、 A_{BOH} 标准 2、 A_{BOH} 空白 2。计算 $\Delta A_{\text{BOH}} \text{ 样本} = A_{\text{BOH}} \text{ 样本 2} - A_{\text{BOH}} \text{ 样本 1}$, $\Delta A_{\text{BOH}} \text{ 标准} = A_{\text{BOH}} \text{ 标准 2} - A_{\text{BOH}} \text{ 标准 1}$, $\Delta A_{\text{BOH}} \text{ 空白} = A_{\text{BOH}} \text{ 空白 2} - A_{\text{BOH}} \text{ 空白 1}$ 。

空白管和标准管只需做 1-2 次。

3、AcAc 含量测定:

试剂名称 (μL)	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_{AcAc} 样本 1、 A_{AcAc} 标准 1、 A_{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_{AcAc} 样本 2、 A_{AcAc} 标准 2、 A_{AcAc} 空白 2。计算 $\Delta A_{\text{AcAc}} \text{ 样本} = A_{\text{AcAc}} \text{ 样本 2} - A_{\text{AcAc}} \text{ 样本 1}$, $\Delta A_{\text{AcAc}} \text{ 标准} = A_{\text{AcAc}} \text{ 标准 2} - A_{\text{AcAc}} \text{ 标准 1}$, $\Delta A_{\text{AcAc}} \text{ 空白} = A_{\text{AcAc}} \text{ 空白 2} - A_{\text{AcAc}} \text{ 空白 1}$ 。

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

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

$$= 1.586 \times (\Delta A_{\text{BOH}} \text{ 样本} - \Delta A_{\text{BOH}} \text{ 空白}) \div (\Delta A_{\text{BOH}} \text{ 标准} - \Delta A_{\text{BOH}} \text{ 空白})$$



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_{BOH} : BOH 标准溶液 1 浓度, 0.2mg/mL; C_{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, 108.02mg/mmol; 1000: 单位换算系数, 1mmol=1000 μ 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 ΔA 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 μ L, 则工作液调整为 160 μ 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 μ 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

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

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

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

相关发表文献:

- [1] Gao X, Jian L, Zhang L, Xu Y, Zhao Y, Yang Y, Yuan Y, Wang Y, Xu S, Ren B, Li Z, Wang C, Li J, Gu Y, Ye J. Perilipin 5 protects the mitochondrial oxidative functions and improves the alcoholic liver injury in mice. Liver Int. 2024 Feb;44(2):357-369. doi: 10.1111/liv.15775. Epub 2023 Nov 6. PMID: 37933091.
- [2] Qin Z, Wang P, Chen W, Wang JR, Ma X, Zhang H, Zhang WJ, Wei C. Hepatic ELOVL3 is dispensable for lipid metabolism in mice. Biochem Biophys Res Commun. 2023 May 28; 658:128-135. doi: 10.1016/j.bbrc.2023.03.075. Epub 2023 Apr 1. PMID: 37030067.

相关系列产品:

BC0710/BC0715 α -酮戊二酸脱氢酶 (α -KGDH) 活性检测试剂盒
BC2150/BC2155 柠檬酸 (CA) 含量检测试剂盒
BC0950/BC0955 琥珀酸脱氢酶 (SDH) 活性检测试剂盒
BC0380/BC0385 丙酮酸脱氢酶 (PDH) 活性检测试剂盒
BC2160/BC2165 线粒体异柠檬酸脱氢酶 (ICDHm) 活性检测试剂盒

