

乙酰乙酸 (AcAc) 含量检测试剂盒 (WST-1法)

(可见分光光度法)

产品货号: BA1900

产品规格: 50T/24S

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。乙酰乙酸即可转化成丙酮,也可以转化成 β -羟丁酸。

在pH7.0和37°C条件下,AcAc在 β -羟丁酸脱氢酶(HBDH)催化下发生反应,同时NADH被氧化成NAD⁺;在1-mPMS作用下,WST-1可与NADH反应,产生水溶性formazan,在450nm下有特征吸收峰。通过检测450nm下波长变化,可计算出AcAc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。

产品内容:

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体60mL×1瓶	2-8°C
试剂一	液体70mL×1瓶	2-8°C
试剂二	粉剂×2支	-20°C
试剂三	粉剂×2支	-20°C
显色液	液体4mL×1支	-20°C
标准品	粉剂×1支	2-8°C

溶液的配制:

1. 试剂二: 临用前取一支加入1.5mL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. 试剂三: 临用前取一支加入400 μ L蒸馏水(约40T),充分溶解。用不完的试剂分装后-20°C保存,可以保存2周。避免反复冻融。(试剂三由于不便保存,故多给一支)
3. 标准品: 8mg乙酰乙酸锂。临用前加入950 μ L蒸馏水,充分溶解,即8mg/mL乙酰乙酸锂标准溶液。-20°C分装保存4周。
4. 工作液配制: 临用前根据试验所需量将试剂一、试剂二、试剂三按照85:4:1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。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计、低温离心机、超声波细胞破碎仪、可调式移液器、1mL玻璃比色皿、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):



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话:400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

1. 组织样本的制备：按照质量（g）：提取液体积（mL）为 1: 5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液）加入提取液，冰浴匀浆后于 4°C，12000 g 离心 10min 后取上清待测。
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（10⁴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）；12000g 4°C离心 10min，取上清，置冰上待测。
3. 血清（浆）等其它液体样本：直接测定。

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. 标准溶液配制：将 80μmol/mL 乙酰乙酸锂标准溶液，用蒸馏水稀释至 2.5、2、1.5、1、0.5、0.25、0.125、0.0625 μmol/mL 标准溶液待用。
3. 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	
标准溶液				100
工作液	900		900	900
试剂三		900		
37°C条件下反应 10min				
显色液	50	50	50	50
37°C条件下反应 20min				
于 450nm 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：以乙酰乙酸锂标准溶液浓度为横坐标（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

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

(2) 按照样本质量计算

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

(3) 按照细胞或细菌数量计算

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

(4) 按照血清（浆）体积计算

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

V 样：反应中加入样本体积，100μL=0.1mL；C_{pr}：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；cell：细胞或细菌总数，10⁴；V 样总：加入提取液体积，1mL；108.02：AcAc 分子量。

注意事项：

1. 显色完成后，请在 10min 之内完成检测。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
 Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com