

## 乙酰乙酸 (AcAc) 含量检测试剂盒 (WST-1法) (微量法)

产品货号: BA1901

产品规格: 100T/48S

### 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 $\beta$ -羟丁酸。

在pH7.0和37°C条件下, AcAc在 $\beta$ -羟丁酸脱氢酶(HBDH)催化下发生反应,同时NADH被氧化成NAD<sup>+</sup>;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110mL×1瓶	2-8°C
试剂一	液体25mL×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1.5mL×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. 试剂三: 临用前取一支加入400 $\mu$ L蒸馏水,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 $\mu$ 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170:8:2(180 $\mu$ L, 1T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。

### 需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、超声波细胞破碎仪、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、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):

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。



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

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）；12000g 4℃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/酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 450nm，蒸馏水调零。
2. 标准溶液配制：将 80 $\mu$ mol/mL 乙酰乙酸锂标准溶液，用蒸馏水稀释至 0.25、0.2、0.15、0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625mg/mL 标准溶液待用。
3. 按下表步骤加样：

试剂名称（ $\mu$ L）	测定管	对照管	空白管	标准管
样本	20	20		
蒸馏水			20	
标准溶液				20
工作液	180		180	180
试剂三		180		
37℃条件下反应 10min				
显色液	10	10	10	10
37℃条件下反应 20min				
取 200 $\mu$ L 至 96 孔板或微量玻璃比色皿中，于 450nm 处测定吸光度。分别记为 A 测定、A 对照、A 空白、A 标准。 $\Delta A$ 测定=A 空白-(A 测定-A 对照)， $\Delta A$ 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 $\Delta A$  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 $\Delta A$  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

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

#### (2) 按照样本质量计算

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

#### (3) 按照细胞或细菌数量计算

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

#### (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，20 $\mu$ L=0.02mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细胞数量：细胞或细菌总数，以  $10^4$  计；V 样总：加入提取液体积，1mL；108.02：乙酰乙酸锂分子量，mg/mmol。

### 注意事项：

1. 显色完成后，请在 15min 之内完成检测。
2. 如果测定吸光值低于或超过线性范围吸光值，可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。



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