乙酰乙酸 (AcAc）含量检测试剂盒（WST 法)说明书

微量法

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。

规格：100T/48S

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，有疑问请及时联系工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体60 mL×1瓶	2-8℃保存
试剂一	液体25mL×1瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1支	-20℃保存
试剂三	粉剂×2支	-20℃保存
显色液	液体1.5mL×1支	-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600 μL 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100S), 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。(试剂三由于不便保存，故多给一支。)(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。)

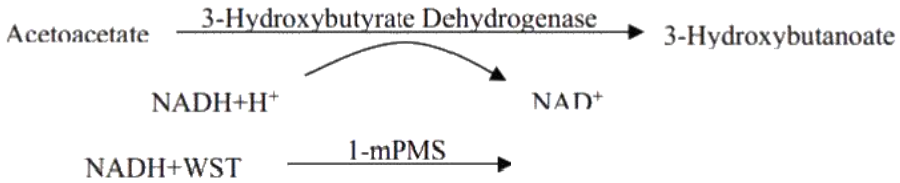
3、标准品：乙酰乙酸锂。临用前加入950μL蒸馏水，充分溶解，即8mg/mL 乙酰乙酸锂标准品。-20℃分装 保存4周。避免反复冻融。

4、工作液配制：临用前根据试验所需量将试剂一、试剂二、试剂三按照168μL:8μL:4μL(180μL ,1 S 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。



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/酶标仪、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、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0.1g组织，加入1mL提取液)加入提取液，冰浴匀浆后于4℃,12000g离心10 min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);12000g4℃ 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，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/酶标仪预热30 min以上，调节波长至450 nm,分光光度计蒸馏水调零。

2、标准品配制：将8mg/mL乙酰乙酸锂标准品，用蒸馏水稀释至0.3、0.2、0.16、0.12、0.08、0.04mg/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(mg/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
6	0.08	150	150	0.04

备注：下述实验中每个标准管需20μL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	20	20	_	_
蒸馏水	_	_	20	_
标准品		_	_	20
工作液	180	_	180	180
试剂一	_	180	_	_
37℃条件下反应10 min				
显色液	10	10	10	10
37℃条件下避光反应20 min				
取200μL至96孔板或微量玻璃比色皿中，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。△A测定=A空白-(A测定-A对照),△A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△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△A 测定带入方程求得x(mg/mL)。

2、计算公式

⑴按照蛋白浓度计算

AcAc含量(μmol/mg prot)=x×V样÷(V 样×Cpr)÷108.02×1000×F=9.258x÷Cpr×F

⑵ 按照样本质量计算

AcAc含量(μmol/g 质量)=x×V 样÷(W×V 样÷V样总)÷108. 02×1000×F=9.258x÷W×F

⑶按照细胞或细菌数量计算

AcAc含量(μmol/10^4cell)=x×V 样÷(N×V 样÷V样总)÷108. 02×1000×F=9.258x÷N×F

⑷按照血清(浆)体积计算

AcAc含量(μmol/mL)=x×V样÷V样÷108. 02×1000×F=9.258x×F

V 样：反应中加入样本体积，20μL=0.02 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，1mL;108.02: 乙酰乙酸锂分子量，mg/mmol;1000: 单位换算系数，1mmol=1000μmol;F: 样本稀释倍数。

注意事项：

1. 显色完成后，请在15min之内完成检测。
2. 如果样本△A 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△A 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2倍后，按照测定步骤操作，使用96孔板测得△A测定=A空白-(A 测定-A对照)=0. 853-(0. 559-0. 121)=0. 415, 根据标准曲线y=1.8273x-0.0763, R^2=0.9931, 计算x=0.269, 按样本质量计算含量得：

   AcAc含量(μmol/g 质量)=9. 258x÷W×F=48.546μmol/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96孔板测得△A测定=A空白-(A测定-A 对照)=0. 853-(0. 655-0. 118)=0. 316, 根据标准曲线y=1.8273x-0.0763 R^2=0.9931,, 计算x=0.215, 按样本质量计算含量得：

   AcAc含量(μmol/g 质量)=9. 258x÷W×F=38.022 μmol/g 质量。
3. 取20 μL 马血清样本，直接按照测定步骤操作，使用96孔板测得△A 测定=△A 测定=A 空白-(A 测定-A 对照)=0. 853-(0. 653-0. 094)=0. 294, 根据标准曲线y=1.8273x-0.0763,计算x=0.203R^2=0.9931, , 按血清(浆)等液体体积计算含量得：

   AcAc含量(μmol/mL)=9.258x×F=1.879μmol/mL。