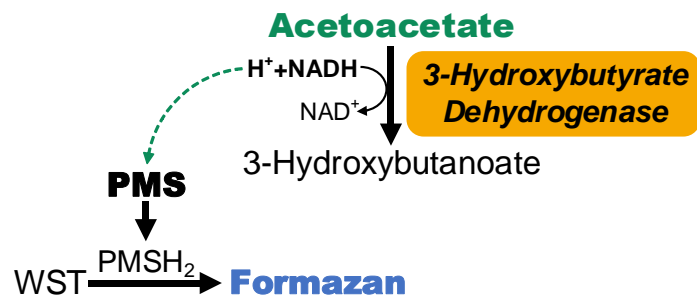




乙酰乙酸 (AcAc) 含量检测试剂盒
Acetoacetate (AcAc) Content Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



乙酰乙酸 (AcAc) 含量检测试剂盒

Acetoacetate (AcAc) Content Assay Kit

一、产品描述

乙酰乙酸 (AcAc) 是酮体的重要组成部分, 主要通过线粒体中的乙酰辅酶 A 缩合形成, 并参与脂肪酸的氧化过程。在饥饿或糖尿病等代谢紊乱状态下, 由于葡萄糖供应不足, 脂肪酸的氧化增加, 导致乙酰辅酶 A 积累, 从而促进乙酰乙酸的生成, 并可以作为替代能源被利用, 转化为丙酮或 β -羟丁酸。乙酰乙酸含量分析对糖尿病诊断和管理、代谢紊乱状态下的生理变化等研究具有重要意义。

3-羟基丁酸脱氢酶 (HBDH) 能够催化乙酰乙酸和 NADH 生成 3-羟基丁酮酸和 NAD^+ , NADH 可通过 PMS 的递氢作用, 还原 WST-1 生成甲臞 (Formazan), 产物在 450 nm 处具有特征吸收峰, 通过吸光值变化即可定量检测乙酰乙酸的含量。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 30 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一	液体 70 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	粉剂×1 瓶	-20°C 保存	使用前加入 3 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存一个月, 避免反复冻融)
试剂三	粉剂×3 支	-20°C 保存	使用前每支加入 400 μL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存两周, 避免反复冻融)
试剂四	液体 4 mL×1 瓶	-20°C 保存	-
标准品	粉剂×1 支	-20°C 保存	使用前加入 950 μL 蒸馏水充分溶解 (即为 8 mg/mL 乙酰乙酸锂标准液)
标准稀释液的制备 (现用现配): 使用前将 8 mg/mL 乙酰乙酸锂标准液使用蒸馏水稀释至 0.3、0.25、0.20、0.16、0.12、0.08 mg/mL 即为标准稀释液。			

序号	A	1	2	3	4	5	6
稀释前浓度 (mg/mL)	8	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
标准液体积 (μL)	125	150	125	100	80	60	40
蒸馏水体积 (μL)	875	350	375	400	420	440	460
稀释后浓度 (mg/mL)	1.0	0.3	0.25	0.20	0.16	0.12	0.08

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂: 可见分光光度计、1 mL 玻璃比色皿 (光径 10 mm、狭缝 3 mm、体积 1.05 mL)、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1. 样品处理 (可根据预实验结果适当调整样本量及比例)

①组织: 按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: (5-10) 的比例 (建议称取 0.1 g 组织, 加入 1 mL 提取液) 处理样品, 冰浴匀浆, 4°C 12000 g 离心 10 min, 取上清置于冰上待测。

②细菌或细胞: 离心收集细菌或细胞至离心管内, 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 1000 万细菌或细胞加入 1 mL 提取液) 处理样品, 冰浴超声破碎 (功率 200 W, 超声 3 s, 间隔 10 s, 重复 30 次), 4°C 12000 g 离心 10 min, 取上清置于冰上待测。

③血清 (浆)、培养液等液体样本: 直接检测或适当稀释后再进行检测。

2. 测定步骤

①分光光度计预热 30 min 以上, 调节波长至 450 nm, 蒸馏水调零。

②检测工作液的制备 (现用现配): 根据使用液按试剂一: 试剂二: 试剂三=42:2:1 的体积比配制, 充分混匀即为检测工作液, 使用前置于 37°C 预热 15 min, 配制后 4 h 内有效。

③在离心管中依次加入下列试剂 (避光条件下进行):

试剂	测定管 (μL)	对照管 (μL)	标准管 (μL)	空白管 (μL)
待测样本	100	100	-	-
标准稀释液	-	-	100	-
蒸馏水	-	-	-	100
检测工作液	900	-	900	900
试剂一	-	900	-	-
充分混匀, 37°C 反应 10 min				
试剂四	50	50	50	50
充分混匀, 37°C 避光准确反应 20 min				

吸光值测定 (15 min 内完成测定): 将反应液置于 1 mL 玻璃比色皿中, 测定 450 nm 处吸光值, 记为 A 测定、A 对照、A 标准和 A 空白; 计算 ΔA 测定 = A 空白 - (A 测定 - A 对照), ΔA 标准 = A 空白 - A 标准。注: 每个样本均需设一个对照管, 各浓度标准管和空白管只需测定 1-2 次。

标准曲线的建立: 以 0.3、0.25、0.20、0.16、0.12、0.08 mg/mL 为横坐标 (x), 以其对应的 ΔA 标准为纵坐标 (y), 绘制标准曲线, 得到标准方程 $y=kx+b$, 将 ΔA 测定带入公式中得到 x (mg/mL)。

3. 乙酰乙酸 (AcAc) 含量计算

① 按组织蛋白浓度计算

$$\text{乙酰乙酸含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) = \frac{x \times 10^3 \times D}{\text{Cpr} \times \text{Mr}} = \frac{9.258 \times x \times D}{\text{Cpr}}$$

② 按组织样本质量计算

$$\text{乙酰乙酸含量 } (\mu\text{mol/g}) = \frac{x \times V_{\text{样总}} \times 10^3 \times D}{W \times \text{Mr}} = \frac{9.258 \times x \times D}{W}$$

③ 按细菌或细胞数量计算

$$\text{乙酰乙酸含量 } (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = \frac{x \times V_{\text{样总}} \times 10^3 \times D}{\text{细菌或细胞数量} \times \text{Mr}} = \frac{9.258 \times x \times D}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④ 按液体样本体积计算

$$\text{乙酰乙酸含量 } (\mu\text{mol/mL}) = \frac{x \times 10^3 \times D}{\text{Mr}} = 9.258 \times x \times D$$

注释: V 样总: 待测样本总体积, 1 mL; Cpr: 待测样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 细菌或细胞数量: 以万计; Mr: 乙酰乙酸锂分子量, 108.02 mg/mmol; D: 待测样本稀释倍数, 若未稀释则为 1; 10^3 : 单位换算系数, 1 mmol=1000 μmol 。

四、注意事项

① 若 A 测定或 ΔA 测定超出标准吸光值线性范围: 高于最高值建议将待测样本使用蒸馏水适当稀释后再进行测定; 低于最低值建议制备更高浓度样本后再进行测定, 计算时相应修改;

② 为保证结果准确且避免试剂损失, 测定前请仔细阅读说明书 (以实际收到说明书内容为准), 确认试剂储存和准备是否充分, 操作步骤是否清楚, 且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定, 过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

