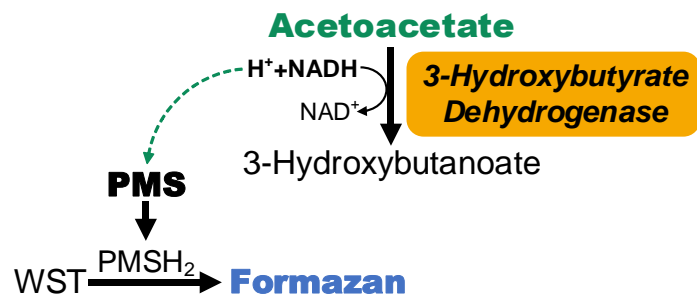




乙酰乙酸 (AcAc) 含量检测试剂盒  
Acetoacetate (AcAc) Content Assay Kit



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  $\beta$ -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  $\text{NAD}^+$ , NADH 可通过 PMS 的递氢作用, 还原 WST-1 生成甲贍 (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 60 mL×1 瓶  | 4°C 保存   | -  |
| 试剂一   | 液体 25 mL×1 瓶  | 4°C 保存   | -  |
| 试剂二   | 粉剂×1 支        | -20°C 保存 | 使用前加入 600 $\mu\text{L}$ 蒸馏水充分溶解<br>(分装后-20°C可保存一个月, 避免反复冻融)  |
| 试剂三   | 粉剂×2 支        | -20°C 保存 | 使用前每支加入 400 $\mu\text{L}$ 蒸馏水充分溶解<br>(分装后-20°C可保存两周, 避免反复冻融) |
| 试剂四   | 液体 1.5 mL×1 支 | -20°C 保存 | -  |
| 标准品   | 粉剂×1 支        | -20°C 保存 | 使用前加入 950 $\mu\text{L}$ 蒸馏水充分溶解<br>(即为 8 mg/mL 乙酰乙酸锂标准液)     |
| <b>标准稀释液的制备 (现用现配):</b> 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、0.20、0.16、0.12、0.08、0.04 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 ( $\mu\text{L}$ ) | 125 | 150 | 100  | 80   | 60   | 40   | 20   |
| 蒸馏水体积 ( $\mu\text{L}$ ) | 875 | 350 | 400  | 420  | 440  | 460  | 480  |
| 稀释后浓度 (mg/mL)           | 1.0 | 0.3 | 0.20 | 0.16 | 0.12 | 0.08 | 0.04 |

### 三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：酶标仪、96孔板、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酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 450 nm。

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 96 孔板中依次加入下列试剂（避光条件下进行）：

| 试剂                      | 测定组<br>( $\mu\text{L}$ ) | 对照组<br>( $\mu\text{L}$ ) | 标准组<br>( $\mu\text{L}$ ) | 空白组<br>( $\mu\text{L}$ ) |
|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 待测样本                    | 20                       | 20                       | -                        | -                        |
| 标准稀释液                   | -                        | -                        | 20                       | -                        |
| 蒸馏水                     | -                        | -                        | -                        | 20                       |
| 检测工作液                   | 180                      | -                        | 180                      | 180                      |
| 试剂一                     | -                        | 180                      | -                        | -                        |
| 充分混匀，37°C 反应 10 min     |                          |                          |                          |                          |
| 试剂四                     | 10                       | 10                       | 10                       | 10                       |
| 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）：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  $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{空白}} - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}})$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{空白}} - A_{\text{标准}}$ 。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、0.20、0.16、0.12、0.08、0.04 mg/mL 为横坐标（x），以其对应的  $\Delta A$  标准为纵坐标（y），绘制标准曲线，得到标准方程  $y=kx+b$ ，将  $\Delta A_{\text{测定}}$  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<sup>3</sup>：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.

Liaodong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

