

β-羟丁酸 (β-HB) 含量检测试剂盒 (WST-1法) (微量法)

产品货号: BA1903

产品规格: 100T/48S

产品简介:

β-羟丁酸(β-HB), 在严重酸中毒患者体内, 由于酸中毒使患者体内NADH生成增加, 进而促使β-羟丁酸与乙酰乙酸的比值自正常的2:1提高至16:1。β-羟丁酸在检测糖尿病酮症酸中毒诊断、治疗中有重要意义, 对糖尿病的早期诊断也有重要意义。本试剂盒适用于血清、血浆、尿液等样本。

在pH8.8和37℃条件下, β-HB在β-羟丁酸脱氢酶(HBDH)催化下发生反应, 同时NAD⁺被还原成NADH; 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β-HB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。

产品组成:

| 试剂名称 | 规格 | 保存条件 |
|------|------------|------|
| 试剂一 | 液体25mL×1瓶 | 2-8℃ |
| 试剂二 | 粉剂×2支 | -20℃ |
| 试剂三 | 粉剂×2支 | -20℃ |
| 显色液 | 液体1.5mL×1支 | -20℃ |
| 标准品 | 粉剂×1支 | 2-8℃ |

溶液的配制:

1. 试剂二: 临用前取一支加入 600μL 蒸馏水, 充分溶解。用不完的试剂分装后-20℃可保存 3 周。避免反复冻融。
2. 试剂三: 临用前取一支加入 400μL 蒸馏水, 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(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)。(试剂三由于不便保存, 故多给一支)
3. 标准品: 3-羟基丁酸钠。临用前加入 980μL 蒸馏水, 充分溶解, 即 8mg/mL 3-羟基丁酸钠标准溶液。2-8℃保存 1 个月。
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(共 180μL, 1T 的量)的比 4 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。

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、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、适用样本

血清、血浆、尿液等样本, 直接检测即可, 若溶液有浑浊可离心后进行测定。

二、测定步骤

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 450nm, 分光光度计蒸馏水调零。
2. 标准溶液配制: 将 8mg/mL 3-羟基丁酸钠标准溶液, 用蒸馏水稀释至 0.125、0.0625、0.03125、0.015625、0.0078125mg/mL 标准溶液待用。(注意不要在此步骤直接检测吸光值)



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

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 | 20 | 20 | - | - |
| 蒸馏水 | - | - | 20 | - |
| 标准溶液 | - | - | - | 20 |
| 工作液 | 180 | - | 180 | 180 |
| 试剂一 | - | 180 | - | - |
| 37°C条件下反应10min | | | | |
| 显色液 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 37°C条件下避光反应20min后, 取200μL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。ΔA测定=A测定-A对照, ΔA标准=A标准-A空白。空白管只需做1-2次; 标准曲线只需做1-2次。 | | | | |

三、β-HB 含量计算

1. 标准曲线绘制: 以β-HB 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

$$\beta\text{-HB含量}(\mu\text{mol/mg prot})=x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div 126.09 \times 1000 = 7.931x \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按照血清(浆)体积计算

$$\beta\text{-HB含量}(\mu\text{mol/mL})=x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div 126.09 \times 1000 = 7.931x$$

V样: 反应中加入样本体积, 20μL=0.02mL; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; V样总: 加入提取液体积, 1mL; 126.09: β-羟基丁酸钠的分子量, mg/mmol; 1000: 1mmol=1000μmol。

注意事项:

- 显色完成后, 请在 10min 之内完成检测。
- 如果ΔA 测定低于或超过标准曲线吸光值范围, 可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。

实验实例:

- 取 20μL 牛血清按上述步骤进行实验, 用 96 孔板测定后进行计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照 =0.455-0.082=0.373, 带入标准曲线 $y=0.4913x+0.0043$, 得 $x=0.750$ 。计算
β-HB含量(μmol/mL)=7.931x=5.948μmol/mL



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com