



## 总胆汁酸(TBA)含量(酶循环比色法)测定试剂盒说明书

(货号: G1220W96 微板法 96 样)

### 一、产品简介:

TBA 由肝脏分解代谢, 其血清浓度升高反映肝实质性损伤。因此, TBA 测定用于监测慢性肝病价值很大。

胆汁酸被 3 $\alpha$ -羟甾醇脱氢酶(3 $\alpha$ -HSD)以及氧化型 $\beta$ -硫代烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(Thio-NAD)特异性氧化, 生成 3-酮类固醇以及还原型 $\beta$ -硫代烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(Thio-NADH)。生成的 3-酮类固醇在 3 $\alpha$ -羟甾醇脱氢酶及还原型 $\beta$ -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(Thio-NADH)存在下, 再生成胆汁酸及氧化型 $\beta$ -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)。如上所述循环放大使检测灵敏度提高。测定在单位时间内生成的还原型 $\beta$ -硫代烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(Thio-NADH)在 405nm 处的吸光度变化, 以求得胆汁酸的含量。

### 二、试剂盒组分与配制:

| 试剂名称 | 规格                    | 保存要求              | 备注                  |
|------|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 试剂一  | 液体 20mL $\times$ 1 瓶  | 4 $^{\circ}$ C 保存 |                     |
| 试剂二  | 液体 5mL $\times$ 1 瓶   | 4 $^{\circ}$ C 保存 |                     |
| 标准管  | 液体 0.2mL $\times$ 1 支 | 4 $^{\circ}$ C 保存 | 浓度为 50 $\mu$ mol/L。 |

### 三、所需仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、离心机、蒸馏水。

### 四、总胆汁酸(TBA)含量检测:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

#### 1、样本制备:

① 液体样品: 澄清的液体可直接检测; 若浑浊则离心后取上清液检测。

② 组织样本:

称取约 0.1g 组织样本加入研钵中, 加入 1mL 无水乙醇, 在冰上进行匀浆, 若有损失则用无水乙醇补充到 1mL, 12000rpm, 4 $^{\circ}$ C 或室温离心 10min, 取上清液待测。

③ 细胞样本:

先收集细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 无水乙醇, 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); 12000rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 ( $10^4$ ): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

#### 2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min, 设置温度在 37 $^{\circ}$ C, 设定波长到 405nm。

② 所有试剂解冻至室温, 在 96 孔板中依次加入:

| 试剂名称 (μL)                                                                      | 测定管 | 空白管<br>(仅做一次) | 标准管<br>(仅做一次) |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----|---------------|---------------|
| 样本                                                                             | 10  |               |               |
| 蒸馏水                                                                            |     | 10            |               |
| 标准品                                                                            |     |               | 10            |
| 试剂一                                                                            | 200 | 200           | 200           |
| 试剂二                                                                            | 50  | 50            | 50            |
| 混匀, 37°C 孵育 0.5min 后, 于 405nm 处读取 A1, 再孵育 10min 后读取 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。 |     |               |               |

- 【注】: 1. 若 A2 值大于 2, 须用生理盐水或蒸馏水对样本上清液进行稀释, 稀释倍数 D 代入计算公式; 或缩短读值时间 (如 10min 降低为 5min 后读取 A2) (测定管和标准管和空白管需同时缩短)。
2. 若  $\Delta A$  值小于 0.005, 可增加样本加样体积 V1 (如由 10μL 增至 20μL, 空白管也由 10μL 增至 20μL 蒸馏水, 标准管为 10μL+10μL 蒸馏水 (总体积同测定管和空白管即 20μL); 其他试剂均保持不变); 或者延长孵育时间 (如再孵育 20min 后读取 A2); 或者增加组织样本的取样质量 W; 则改变后的 V1 和 W 代入公式重新计算。

## 五、结果计算:

### 1、按照体积计算:

$$\begin{aligned} \text{总胆汁酸(TBA)}(\mu\text{mol/L}) &= (C_{\text{标准}} \times V_2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div V_1 \times D \\ &= C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \times D \end{aligned}$$

### 2、按照样本质量计算:

$$\begin{aligned} \text{总胆汁酸(TBA)}(\text{nmol/g 重量}) &= (C_{\text{标准}} \times V_2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div (V_1 \div V \times W) \times D \\ &= C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div W \times D \end{aligned}$$

### 3、按细胞数量计算:

$$\begin{aligned} \text{总胆汁酸(TBA)}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) &= (C_{\text{标准}} \times V_2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div (V_1 \div V \times 500) \times D \\ &= C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div 500 \times D \end{aligned}$$

C 标准---标品浓度, 50μmol/L=50nmol/mL; V1---加入样本体积, 0.01mL;

V2---加入标准品体积, 0.01mL; V---提取液体积, 1mL;

500---细胞数量, 万; W---组织样本取样质量, g;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1。