

总胆汁酸(TBA)含量(酶循环比色法)测定试剂盒说明书

(货号: G1220W48 微板法 48 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 α -羟甾醇脱氢酶(3 α -HSD)以及氧化型 β -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 β -硫代烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(Thio-NADH)。生成的 3-酮类固醇在 3 α -羟甾醇脱氢酶及还原型 β -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 β -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 β -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 10mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 2.5mL×1 瓶	4°C保存	
标准管	液体 0.2mL×1 支	4°C保存	浓度为 50 μ 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°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°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°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 (仅做一次)	标准管 (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, $\Delta A = A2 - A1$ 。			

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。