

总胆汁酸(TBA)含量(酶循环比色法)测定试剂盒说明书

(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 (μ L)	测定管	空白管	标准管
-----------------	-----	-----	-----

		(仅做一次)	(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 1.5min 后, 于 405nm 处读取 A1, 3min 后读取 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。			

【注】: 1.若 A2 值大于 0.8, 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。

2.若 ΔA 值小于 0.005, 可增加样本加样体积 V1 (如由 10 μ L 增至 20 μ L, 空白管也由 10 μ L 增至 20 μ L 蒸馏水, 标准管为 10 μ L+10 μ L 蒸馏水 (总体积同测定管和空白管即 20 μ L); 其他试剂均保持不变); 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:

$$\begin{aligned} \text{总胆汁酸(TBA)}(\mu\text{mol/L}) &= (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div \text{V1} \times \text{D} \\ &= \text{C 标准} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \times \text{D} \end{aligned}$$

2、按照样本质量计算:

$$\begin{aligned} \text{总胆汁酸(TBA)}(\text{nmol/g 重量}) &= (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div (\text{V1} \div \text{V} \times \text{W}) \times \text{D} \\ &= \text{C 标准} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div \text{W} \times \text{D} \end{aligned}$$

3、按细胞数量计算:

$$\begin{aligned} \text{总胆汁酸(TBA)}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) &= (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div (\text{V1} \div \text{V} \times 500) \times \text{D} \\ &= \text{C 标准} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空}}) \div 500 \times \text{D} \end{aligned}$$

C 标准---标品浓度, 50 μ mol/L=50nmol/mL;

V1---加入样本体积, 0.001mL;

V2---加入标准品体积, 0.001mL;

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。