

总胆汁酸(TBA)含量(酶循环比色法)测定试剂盒说明书

(货号: BP10471 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 20mL $\times$ 1 瓶	4 $^{\circ}$ C避光保存	
试剂二	液体 5mL $\times$ 1 瓶	4 $^{\circ}$ C避光保存	
标准管	液体 0.2mL $\times$ 1 支	4 $^{\circ}$ C避光保存	浓度见标签

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、96孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min(等待仪器过自检程序亦可), 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:

试剂组分 (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 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 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、按照蛋白浓度计算:

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

3、按照样本质量计算:

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

4、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, 见标签;

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;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

