

总胆汁酸含量试剂盒(酶循环比色法)试剂盒

规格：100 管/96 样

检测原理：微量法

编号：ml301000

检测波长：405nm

注意：

正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

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。

测定原理：

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。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、蒸馏水。

试剂的组成和配制：

试剂一：液体 20mL×1 瓶，-20℃避光保存；

试剂二：5mL×1 瓶，-20℃避光保存；

标准管:液体 1mLx1 支,4℃避光保存;浓度为 1mmol/L。临用前用蒸馏水稀释至 50μmol/L;

样品提取:

一、组织样本的处理:

称取 0.1g 组织样本加入 1mL 无水乙醇,冰浴匀浆,12000rpm,4℃离心 10min,取上清待测;

二、细胞样本处理:

取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 无水乙醇,超声波破碎(冰浴,功率 200W,超声 3s,间隔 10s,重复 30 次),12000rpm,4℃离心 10min,取上清待测;

三、液体样本处理:

澄清的液体可直接检测;若浑浊则离心后取上清液检测;

测定步骤:

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上,设置温度在 37℃,调节波长至 405nm。

2、所有试剂解冻至室温。

3、在 96 孔板中加入下列试剂:

试剂名称(μL)	测定管	空白管(只做一管)	标准管(只做一管)
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℃孵育 30s 后,于 405nm 处读取吸光值 A1,再孵育 10min 后读取吸光值			

$$A2\Delta A = A2 - A1$$

结果计算：

1、按样本质量计算：

$$\text{总胆汁酸(nmol/g)} = (C \text{ 标准} \times V2) \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \div (V1 \div V \times W) \times D$$

$$= 50 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \div W \times D$$

2、按细胞数量计算：

$$\text{总胆汁酸(nmol/10}^4\text{cell)} = (C \text{ 标准} \times V2) \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \div (V1 \div V \times 500) \times D$$

$$= 50 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \div 500 \times D$$

3、按液体体积计算：

$$\text{肌酸含量(}\mu\text{mol/L)} = (C \text{ 标准} \times V2) \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \div V1 \times D$$

$$= 50 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \times D$$

4、按蛋白浓度计算：

$$\text{总胆汁酸(nmol/mg prot)} = (C \text{ 标准} \times V2) \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \div V1 \div Cpr \times D$$

$$= 50 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \div Cpr \times D$$

V：加入提取液体积，1 mL；

V1：加入样本体积，0.01mL；

V2：加入标准品体积，0.01mL；

D：稀释倍数，未稀释为 1；

W：样本质量，g；

500: 细胞数量, 万;

C 标准: 标准品浓度, $50\mu\text{mol/L}=50\text{nmol/mL}$; Cpr: 蛋白浓度, mg/mL
Cpr: 蛋白浓度, mg/mL

预实验的意义:

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测, 以免造成试剂盒和样本的浪费 (比如低表达处理的样本);
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程, 尤其是初次使用生化试剂盒测定;
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适;
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题, 以便于及时作出调整;
- 5、通过 3 - 5 组预实验, 判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围, 指导实验样本稀释比例。