

总胆汁酸含量(TBA)活性试剂盒

规格：100管/96样

检测原理：微量法

编号：JLC_K14875

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3a-羟甾醇脱氢酶(3a-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3a-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1mL×1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 $A = A2 - A1$			

结果计算：

1、按样本质量计算：

总胆汁酸(nmol/g) = $(C_{\text{标准}} \times V_2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (V_1 \div V \times W) \times$

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

2、按细胞数量计算：

总胆汁酸(nmol/10⁴cell) = $(C_{\text{标准}} \times V_2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (V_1 \div V \times$

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

3、按液体体积计算：

肌酸含量($\mu\text{mol/L}$) = $(C_{\text{标准}} \times V_2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div V_1 \times D$

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

4、按蛋白浓度计算：

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

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

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适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。