总胆汁酸(TBA)含量(酶循环比色法)测定试剂盒说明书

（微板法 96 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 3α-羟甾醇脱氢酶(3α-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 3α-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 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 5mL×1 瓶	4℃保存	
标准管	液体 0.2mL×1 支	4℃保存	浓度为 50μmol/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℃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℃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℃，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℃孵育 0.5min 后，于 405nm 处读取 A1，再孵育 10min 后读取 A2，△A=A2-A1。			

【注】：1.若 A2 值大于 2，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；或缩短读值时间（如 10min 降低为 5min 后读取 A2）(测定管和标准管和空白管需同时缩短)。

2.若△A 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）；或者延长孵育时间（如再孵育 20min 后读取 A2）；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：

总胆汁酸(TBA)(μmol/L)=(C 标准×V2)×(△A $_{测定}$-△A $_{空白}$)÷(△A $_{标准}$-△A $_{空}$)÷V1×D

=C 标准×(△A $_{测定}$-△A $_{空白}$)÷(△A $_{标准}$-△A $_{空}$)×D

2、按照样本质量计算：

总胆汁酸(TBA)(nmol/g 重量)=(C 标准×V2)×(△A $_{测定}$-△A $_{空白}$)÷(△A $_{标准}$-△A $_{空}$)÷(V1÷V×W)×D

=C 标准×(△A $_{测定}$-△A $_{空白}$)÷(△A $_{标准}$-△A $_{空}$)÷W×D

3、按细胞数量计算：

总胆汁酸(TBA)(nmol/10^4 cell)=(C 标准×V2)×(△A $_{测定}$-△A $_{空白}$)÷(△A $_{标准}$-△A $_{空}$)÷(V1÷V×500)×D

=C 标准×(△A $_{测定}$-△A $_{空白}$)÷(△A $_{标准}$-△A $_{空}$)÷500×D

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。