（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!）

Elabscience®总胆红素(TBIL)比色法测试盒

Total Bilirubin (TBIL) Colorimetric Assay Kit

产品货号：E-BC-K760-M

产品规格：48T(22 samples)/96T(46 samples)

检测仪器：酶标仪(565 nm)

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

销售部电话	027-87879180，027-87854967
技术部电话	13129966790
电子邮箱（销售）	Perry@elabscience.cn
电子邮箱（技术）	biochemical@elabscience.cn
网址	www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测各种动物血清中总胆红素含量。

检测原理

在加速剂作用下，间接胆红素内氢键被破坏，使非水溶性的间接胆红素与直接胆红素，在酸性条件下与偶氮试剂反应生成偶氮胆红素，生成的偶氮胆红素在 565 nm 处有最大吸收，测定吸光度变化可求出血清中总胆红素含量。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size1)(48 T)	规格 2 (Size2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	酸试剂 (Acid Agent)	15 mL×1 瓶	30 mL×1 瓶	2-8℃避光保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	重氮盐 (Diazonium Salt)	5 mL×1 瓶	10 mL×1 瓶	2-8℃保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	终止液 (Stop Solution)	5 mL×1 瓶	5 mL×1 瓶	2-8℃避光保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	标准品 (Standard)	粉剂×2 支	粉剂×2 支	2-8℃避光保存 6 个月
	96 孔酶标板	1 板		
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(565 nm)

试剂准备

① 试剂平衡至室温。

② 工作液的配制：

试剂一：试剂二按体积比=1.2：1 配制混匀，按需配制，现配现用。

③ 25 μmol/L标准品溶液的配制：

每支试剂四用 2 mL 双蒸水溶解，混匀后避光，现配现用。

样本准备

① 样本处理

血清样本：直接测定。

样本要求：血清样本无溶血现象。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.7-50 μmol/L，参考下表进行稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
人血清	不稀释	兔血清	不稀释
大鼠血清	不稀释	鸡血清	不稀释
小鼠血清	不稀释	猪血清	不稀释

注：稀释液为生理盐水(0.9% NaCl)。

实验关键点

① 加入样本时，应快速加入或使用排枪加入。

② 加入标准品和样本时，吸打过程中需防止气泡产生。

操作步骤

① 标准管：取 80 μL 试剂一加入 0.5 mL EP 管中。
标准对照管：取 80 μL 试剂一加入 0.5 mL EP 管中。
测定管：取 80 μL 试剂一加入 0.5 mL EP 管中，
测定对照管：取 80 μL 试剂一加入 0.5 mL EP 管中。

② 向步骤①中标准管与测定管加入 160 μL 工作液，
向步骤①中标准对照管与测定对照管加入 160 μL 双蒸水。

③ 向步骤②中标准管与标准对照管加入 30 μL 25 μmol/L 标准品，
向步骤②中测定管与测定对照管加入 30 μL 样本。

④ 各管混匀，放至 37 ℃ 恒温箱中孵育 5 min。

⑤ 向各管中加入 20 μL 试剂三。

⑥ 混匀，37℃ 恒温箱中孵育 5 min，各管分别取 250 μL 反应液加入酶标板相应的孔中，于 565 nm 处检测各孔吸光度。

操作表

	标准管	标准对照管	测定管	测定对照管
试剂一(μL)	80	80	80	80
工作液(μL)	160	--	160	--
双蒸水(μL)	--	160	--	160
样本(μL)	--	--	30	30
25 μmol/L 标准品(μL)	30	30	--	--
各管混匀，放至 37 ℃ 恒温箱中孵育 5 min。				
试剂三(μL)	20	20	20	20
混匀，37 ℃ 恒温箱中孵育 5 min，各管分别取 250 μL 反应液加入酶标板相应的孔中，于 565 nm 处检测各孔吸光度。				

结果计算

血清样本中的总胆红素含量计算：

$$\text{总胆红素 } \mu\text{mol/L} = \frac{A_2}{A_1} \times C \times f$$

注解：

A_2：测定孔 OD 值-测定对照孔 OD 值

A_1：标准孔 OD 值-标准对照孔 OD 值

C：标准品浓度(25 μmol/L)

f：加入检测体系前样本的稀释倍数

附录1 关键数据

1. 技术参数

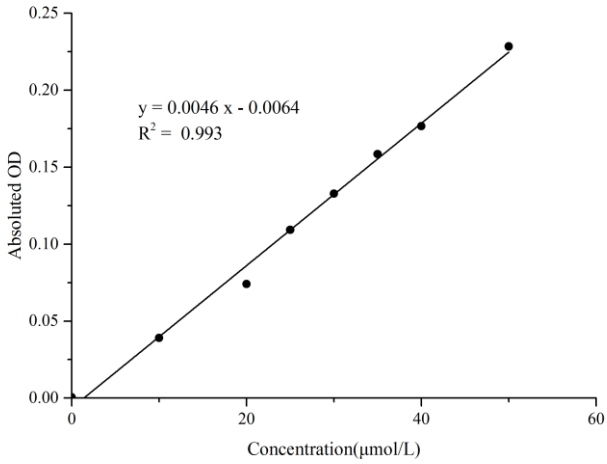
检测范围	0.7-50 μmol/L	平均批间差	4.0 %
灵敏度	0.7 μmol/L	平均批内差	2.8%
回收率	96 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①取50 μmol/L标准品稀释成不同浓度标准品，不同浓度的标准品加样量30 μL，按照操作步骤进行实验，各管OD值如下表所示：

标准品浓度 (μmol/L)	0	10	20	25	30	35	40	50
标准孔 OD 值	0.039	0.079	0.125	0.152	0.176	0.197	0.216	0.274
	0.037	0.079	0.125	0.148	0.173	0.202	0.219	0.271
平均 OD 值	0.037	0.079	0.115	0.150	0.174	0.200	0.217	0.273
标准对照孔 OD 值	0.037	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.044
	0.038	0.039	0.042	0.040	0.042	0.041	0.041	0.044
平均 OD 值	0.038	0.040	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.044
绝对 OD 值	0.000	0.039	0.074	0.109	0.133	0.159	0.177	0.229

②绘制标曲(如下图)：



附录2 实例分析

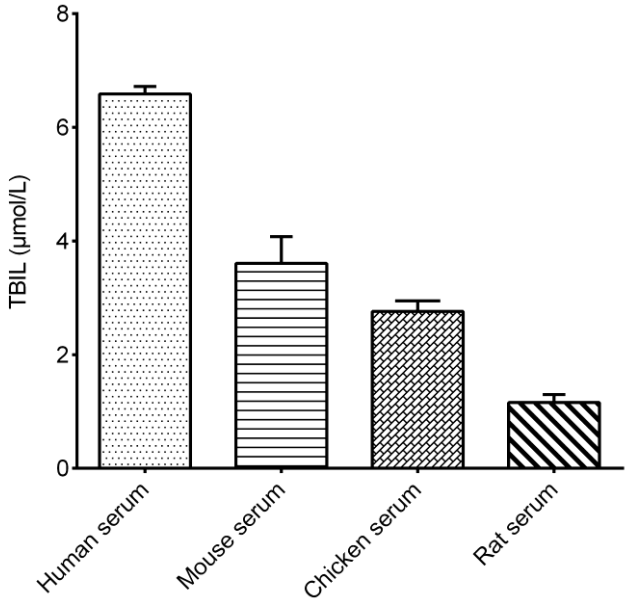
例如检测人血清(数据仅供参考):

取30 μL人血清，按说明书操作，结果如下：

测定孔OD值：0.094，测定对照孔OD值：0.063，25 μmol/L标准品测定孔OD值：0.150，标准品对照孔OD值：0.041，计算结果为：

人血清总胆红素含量(μmol/L) = (0.094-0.063) ÷ (0.150 - 0.041) × 25 = 7.11 μmol/L

按照操作过程，测定人血清(加样量30 μL)、小鼠血清(加样量30 μL)、鸡血清(加样量30 μL)、大鼠血清(加样量30 μL)中直接胆红素含量(如下图)：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本测定不出	样本含量少	加大样本量测定
直接胆红素高于总胆红素	样本溶血	重新处理样本再进行测定

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。