

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号：E-BC-K761-M

产品规格：48T(22 samples)/96T(46 samples)

检测仪器：酶标仪(565 nm)

Elabscience®直接胆红素(DBIL)比色法测试盒

Direct Bilirubin (DBIL) Colorimetric Assay Kit

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：

电话：400-999-2100

邮箱：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直接胆红素含量。

检测原理

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直接胆红素含量。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(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 $\mu\text{mol/L}$ 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。

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：0.6-50 $\mu\text{mol/L}$ ，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 $\mu\text{mol/L}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中孵育 5 min。
- ⑤ 向各管中加入 20 μL 试剂三。
- ⑥ 混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 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 $\mu\text{mol/L}$ 标准品(μL)	30	30	--	--
各管混匀，放至 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中孵育 5 min。				
试剂三(μL)	20	20	20	20
混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 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

血清样本中的直接胆红素含量计算：

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

注解：

A₂：测定孔 OD 值-测定对照孔 OD 值

A₁：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

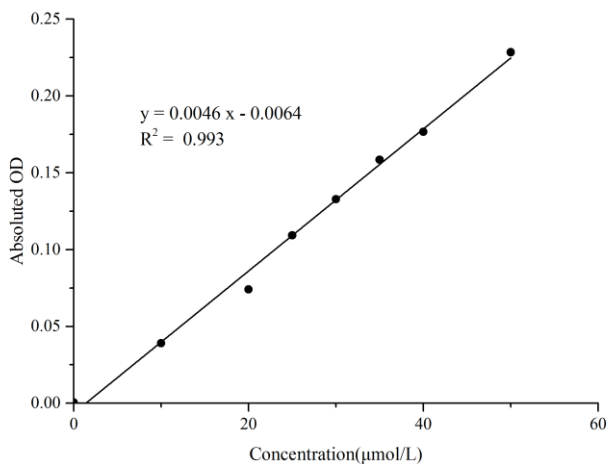
检测范围	0.6-50 $\mu\text{mol/L}$	平均批间差	8.6 %
灵敏度	0.6 $\mu\text{mol/L}$	平均批内差	4.0 %
回收率	100 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①取50 $\mu\text{mol/L}$ 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 ($\mu\text{mol/L}$)	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

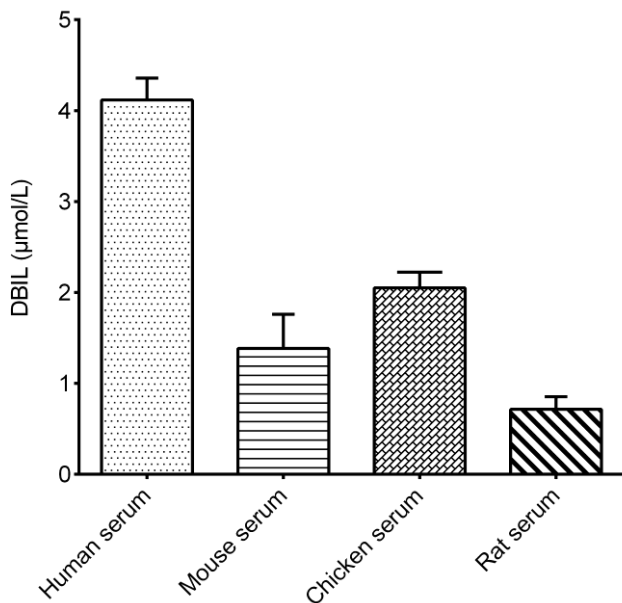
例如检测人血清(数据仅供参考):

取30 μL 人血清,按说明书操作,结果如下:

测定孔OD值: 0.083, 测定对照孔OD值: 0.064, 25 $\mu\text{mol/L}$ 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:

$$\text{人血清直接胆红素含量} = (0.083 - 0.064) \div (0.150 - 0.041) \times 25 = 4.35 \mu\text{mol/L} (\mu\text{mol/L})$$

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	样本加入时未吸打混匀	样本加入时混匀反应体系
	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。

附录4 客户发表文献

1. Zhang X, He C, Chen Y, et al. Cyclic reactions-mediated self-supply of H₂O₂ and O₂ for cooperative chemodynamic/starvation cancer therapy[J]. *Biomaterials*, 2021, 275:120987-. IF:12.479
2. Xia H, Scholtes C, Dufour CR, et al. Insulin action and resistance are dependent on a GSK3 β -FBXW7-ERR α transcriptional axis. *Nat Commun.* 2022; 13 (1):2105. IF:14.919
3. Liu Q, Zhang T X, Zheng Y D, et al. Calixarene-Embedded Nanoparticles for Interference-Free Gene-Drug Combination Cancer Therapy[J]. *Small*, 2021, 2006223. IF:11.459
4. He C, Zhang X, Chen C, et al. A solid lipid coated calcium peroxide nanocarrier enables combined cancer chemo/chemodynamic therapy with O₂/H₂O₂ self-sufficiency[J]. *Acta Biomaterialia*, 2021, 122. IF:8.203
5. Chen L, Tao F, Zhang Y, et al. Islet-cell autoantigen 69 accelerates liver regeneration by downregulating Tgfb1 and attenuating Tgf β signaling in mice[J]. *FEBS Letters*, 2020, 594(17). IF:6.665
6. Omar N, Frank J, Kruger J, et al. Effects of High Intakes of Fructose and Galactose, with or Without Added Fructooligosaccharides, on Metabolic Factors, Inflammation, and Gut Integrity in a Rat Model[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2021:2001133. IF:5.914
7. Wang C, Ma C, Fu K, et al. Phillygenin Attenuates Carbon Tetrachloride-Induced Liver Fibrosis via Modulating Inflammation and Gut Microbiota[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 9, 21. IF:5.81
8. Du Y Q, Zheng Y Z, Yu C X M, et al. The Mechanisms of Yu Ping Feng San in Tracking the Cisplatin-Resistance by Regulating ATP-Binding Cassette Transporter and Glutathione S-Transferase in Lung Cancer Cells[J].*Frontiers in Pharmacology*, 2021; 12: 678126. IF:5.81
9. Zeng X Peng, Wang L J, Guo L H, et al. Dasatinib ameliorates chronic pancreatitis induced by caerulein via anti- fibrotic and anti-inflammatory mechanism[J]. *Pharmacological Research*, 2019, 147, 104357. IF:5.574
10. Cao X, Liang Y, Liu R, et al. Uncovering the Pharmacological Mechanisms of Gexia-Zhuyu Formula (GXZY) in Treating Liver Cirrhosis by an Integrative Pharmacology Strategy. *Front Pharmacol.* 2022; 13:793888. IF:5.331
11. Wang Y, Xie W, Feng Y, et al. Epithelial-derived exosomes promote M2 macrophage

- polarization via Notch2/SOCS1 during mechanical ventilation. *Int J Mol Med.* 2022; 50 (1). IF:5.314
12. Jung D S, Son Y J, Shin J M, et al. Gymnaster Koraiensis Extract Alleviated Metabolic Syndrome Symptoms and Stimulated UCP1-Independent Energy Consumption via AMPK Activation in White Adipose Tissue[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2020. IF:5.309
 13. Ali A K, Komal A K, Almutairi S M, et al. Natural killer cell-derived IL-10 prevents liver damage during sustained murine cytomegalovirus infection[J]. *Frontiers in immunology*, 2019, 10: 2688. IF:5.085
 14. Xu Y , Zhang Y , Xu Y , et al. Activation of CD137 signaling promotes macrophage apoptosis dependent on p38 MAPK pathway-mediated mitochondrial fission[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2021 Jul;136:106003. IF:5.085
 15. Naseh A, Shirin B, Maryam M, et al. Attenuation of chronic arsenic neurotoxicity via melatonin in male offspring of maternal rats exposed to arsenic during conception: Involvement of oxidative DNA damage and inflammatory signaling cascades[J]. *Life Sciences* 266 (2021) 118876. IF:5.037
 16. Ahmed A E, Alshehri A, Al-Kahtani M A, et al. Vitamin E and selenium administration synergistically mitigates ivermectin and doramectin-induced testicular dysfunction in male Wistar albino rats[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 124: 109841. IF:4.545
 17. Su S, Tian H, Jia X, et al. Mechanistic insights into the effects of SREBP1c on hepatic stellate cell and liver fibrosis[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020. IF:4.486
 18. Wang L J, He L, Hao L, et al. Isoliquiritigenin ameliorates caerulein-induced chronic pancreatitis by inhibiting the activation of PSCs and pancreatic infiltration of macrophages[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020. IF:4.486
 19. Dejan Lazić, Andreas Scheurer, Dušan Čočić, et al. New bis-pyrazolopyridine ruthenium(III) complex as a potential anticancer drug: In vitro and in vivo activity in murine colon cancer[J]. *Dalton Transactions*, 2021 Jun; 50(22):7686-7704. IF:4.39
 20. Li X, Lv Z, Chen J, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* B10 can alleviate liver apoptosis and oxidative stress induced by aflatoxin B1[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2021, 151:112124. IF:4.06
 21. Amany Abdel-Rahman Mohamed , Safaa I. Khater , Ahmed Hamed Arisha , et al. Chitosan-stabilized selenium nanoparticles alleviate cardio-hepatic damage in type 2

- diabetes mellitus model via regulation of caspase, Bax/Bcl-2, and Fas/FasL-pathway[J]. *Gene*, 2020, 768(7):145288. IF:3.688
22. Zhang S, Jiang L, Hu H, et al. Pretreatment of exosomes derived from hUCMSCs with TNF- α ameliorates acute liver failure by inhibiting the activation of NLRP3 in macrophage[J]. *Life Sciences*, 2020, 246: 117401. IF:3.647
 23. Yu H, Zhang L, Chen P, et al. Dietary bile acids enhance growth, and alleviate hepatic fibrosis induced by a high starch diet via AKT/FOXO1 and cAMP/AMPK/SREBP1 pathway in *Micropterus salmoides*[J]. *Frontiers in Physiology*, 2019, 10. IF:3.367
 24. Sohini Sen, Shaunak Ghosh, Sayantan De, et al. Immunomodulatory and antimicrobial non-mulberry *Antheraea mylitta* silk fibroin accelerates in vitro fibroblast repair and regeneration by protecting oxidative stress[J]. *RSC Advances*, 2021 May; 11(31):19265-19282. IF:3.361
 25. Li Jianda, Yuan Chen, Liu Peng et al. Red blood cells serve as a vehicle for PEDV transmission.[J]. *Vet Microbiol*, 2021, 257: 109081. IF:3.293
 26. Chen L, Tao F, Zhang Y, et al. Islet-cell autoantigen 69 accelerates liver regeneration by downregulating *Tgfb1* and attenuating *Tgf β* signaling in mice[J]. *FEBS Letters*, 2020. IF:3.057
 27. Cui Y, Wang Y, Liu G. Protective Effect of Barbaloin in a Rat Model of Myocardial Ischemia Reperfusion Injury Through the Regulation of the CNPY2?PERK Pathway[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2019. IF:2.928
 28. Sun Yan-Chun, Han Shi-Cheng, Yao Ming-Zhu, et al. High-throughput metabolomics method based on liquid chromatography-mass spectrometry: Insights into the underlying mechanisms of salinity-alkalinity exposure-induced metabolites changes in *Barbus capito*[J]. *Journal of Separation Science*, 2021 Jan; 44(2):497-512. IF:2.878
 29. Mustafa H N, Hegazy G A, El Awdan S A, et al. Liver ischemia/reperfusion injury, a setting in which the functional mass is reduced and the role of PDE5 inhibitor[J]. *Eur. J. Anat*, 2019, 23(5): 325-332. IF:2.638
 30. Chen L, Ma K, Fan H, et al. Exogenous hydrogen sulfide protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by inhibiting endoplasmic reticulum stress and cell apoptosis.[J]. *Spandidos Publications*, 2021(2). IF:2.447

