

总胆固醇（TC）含量检测试剂盒（微量法）

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定。

产品规格：100管/96样

产品内容：

提取液：异丙醇100mL×1瓶，自备，4℃保存；

试剂一：液体30mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：液体200 μL×1支，4℃保存；

试剂三：液体30 μL×1支，4℃保存；

标准品：粉剂×1支，10mg胆固醇，4℃保存。临用前加入517 μL提取液，振荡溶解，即为50 μmol/mL的胆固醇标准溶液。

工作液的配制：将试剂一：试剂二：试剂三按比例3mL：20 μL：3 μL配制工作液，现用现配。

产品说明：

总胆固醇（Total Cholesterol，TC）是指所有脂蛋白所含胆固醇的总和，包括游离胆固醇和胆固醇酯。

利用酯酶催化胆固醇酯水解生成游离胆固醇（FC）和游离脂肪酸（FFA），从而把胆固醇酯转化为FC；进一步利用胆固醇氧化酶催化FC氧化，生成 Δ^4 -胆甾烯酮和H₂O₂；最后利用过氧化物酶催化H₂O₂氧化4-氨基安替比林和酚，生成红色醌类化合物，其在500nm有特征吸收峰，其颜色深浅与TC含量成正比。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、天平、低温台式离心机、微量玻璃比色皿/96孔板、可调式移液枪、EP管、蒸馏水、异丙醇。

操作步骤：

一、样本处理：

- 组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL提取液）进行冰浴匀浆。10000g，4℃离心10min，取上清置冰上待测。
- 细菌、真菌：按照细胞数量（10⁴个）：提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细胞加入1mL提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率300w，超声2秒，间隔3秒，总时间3min）；然后10000g，4℃离心10min，取上清置于冰上待测。
- 血清（浆）样品：直接测定。

二、测定步骤：

- 分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至500nm，蒸馏水调零。
- 将50μmol/mL 标准液用提取液稀释为2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078μmol/mL 的标准溶液备用。
- 操作表：（在离心管或96孔板中依次加入下列试剂）

试剂名称（uL）	测定管	标准管	空白管
样品	20	-	-
标准溶液	-	20	-
提取液	-	-	20

工作液	180	180	180
充分混匀，37℃静置15min，反应完成后测定500nm处吸光值A，分别记为A测定管、A标准管和A空白管， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ ，空白管只需测一次。			

总胆固醇含量计算

一、标准曲线的绘制：

以各个标准溶液的浓度为x轴，其对应的 ΔA 标准为y轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 带入方程得到 x（ $\mu\text{mol/mL}$ ）

二、总胆固醇含量的计算：

1. 血清（浆）中FC含量计算：

TC含量（ $\mu\text{mol/dL}$ ） $=x \times 100$ 。

2. 组织中FC含量计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算

TC含量（ $\mu\text{mol/mg prot}$ ） $=x \times V_{\text{提取}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{提取}}) = x \div C_{\text{pr}}$ 。

(2) 按样本鲜重计算

TC含量（ $\mu\text{mol/g鲜重}$ ） $=x \times V_{\text{提取}} \div W = x \div W$

3. 细胞、细菌中TC含量计算：

TC含量（ $\mu\text{mol}/10^4\text{cell}$ ） $=x \times V_{\text{提取}} \div 500 = 0.002x$ 。

100: 1dL=100mL；V提取：加入样本的提取液体积，1mL；W：样本质量，g；500:500万个细胞数量。

注意事项：

当 ΔA 大于1.5时，建议将样本用提取液稀释后再进行测定。