

## 总胆固醇（total cholesterol, TC）含量试剂盒说明书

（货号：G0909W500 微板法 500 样）

### 一、产品简介：

总胆固醇（TC）包括游离胆固醇和胆固醇酯。是指组织中所有脂蛋白所含胆固醇之总和。

利用酯酶催化胆固醇酯水解生成游离胆固醇（FC），FC 在胆固醇氧化酶作用下被氧化生成 4-胆甾烯酮和  $H_2O_2$ ；接着与 4-氨基萘替吡啉等反应生成红色醌类化合物，其在 510nm 处有特征吸收峰，通过检测 510nm 处吸光值即可得出 TC 含量。

### 二、试剂盒的组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 65mL×2 瓶	4℃保存	
标准品	液体 1mL×1 支	4℃保存	标准品浓度为 5.17mmol/L。

### 三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、可调式移液枪、水浴锅、乙醇、离心机、研钵、蒸馏水。

### 四、总胆固醇（TC）含量测定：

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 组织样本：

称取约 0.1g 组织样本加入研钵中，加入 1mL 乙醇，进行冰浴匀浆，12000rpm，4℃或室温离心 10min，取上清液待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液（mL）为 1：5~10 的比例进行提取。

##### ② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 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。

##### ③ 液体样本：澄清的液体样本直接测定，若浑浊则离心后取上清检测。

#### 2、上机检测：

① 酶标仪预热 30 min，调节波长到 510 nm。

② 所有试剂解冻至室温（25℃），在 96 孔板中依次加入：

试剂名称（ $\mu$ L）	测定管	标准管 （仅做一次）	空白管 （仅做一次）
样本	2.5		
标准品		2.5	
蒸馏水			2.5
试剂一	250	250	250
混匀，37℃孵育 10min，于 510nm 处读取各管吸光值 A。			

【注】1.若测定管的 A 值大于 1，则需将组织或细胞样本用乙醇进行稀释（若是液体样本如血清需用生理盐水或 PBS 或蒸馏水稀释），稀释倍数 D 需代入公式重新计算。

2.若 A 测定管值低于空白管，可增加样本加样体积 V1（如增至 5 $\mu$ L 或更多，则试剂一保持不变，标准品仍为 2.5 $\mu$ L，额外加 2.5 $\mu$ L 蒸馏水补齐）；或增加样本取样质量 W（如增至 0.2g 或更多），则改变的 V1 和 W 则代入公式重新计算。

3.若样本自身颜色为红色，也可增设一个样本自身对照（即 2.5 $\mu$ L 样本+250 $\mu$ L 蒸馏水）；混匀，37 $^{\circ}$ C 孵育 10min，510nm 读取吸光值 A，（A 测定-A 对照）代入公式计算。

## 五、结果计算：

1、按样本质量计算：

$$\text{TC}(\mu\text{g/g 重量})=(\text{C 标准}\times\text{V2})\times\text{Mr}\times(\text{A 测定}-\text{A 空白})\div(\text{A 标准}-\text{A 空白})\div(\text{W}\times\text{V1}\div\text{V})\times\text{D}$$
$$=1998.7\times(\text{A 测定}-\text{A 空白})\div(\text{A 标准}-\text{A 空白})\div\text{W}\times\text{D}$$

2、按细胞数量计算：

$$\text{TC}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell})=(\text{C 标准}\times\text{V2})\times(\text{A 测定}-\text{A 空白})\div(\text{A 标准}-\text{A 空白})\div(500\times\text{V1}\div\text{V})\times\text{D}$$
$$=4\times(\text{A 测定}-\text{A 空白})\div(\text{A 标准}-\text{A 空白})\times\text{D}$$

3、液体中 TC 含量计算：

$$\text{TC}(\mu\text{g}/\text{mL})=(\text{C 标准}\times\text{V2})\times\text{Mr}\times(\text{A 测定}-\text{A 空白})\div(\text{A 标准}-\text{A 空白})\div\text{V1}\times\text{D}$$
$$=1998.7\times(\text{A 测定}-\text{A 空白})\div(\text{A 标准}-\text{A 空白})\times\text{D}$$

$$\text{TC}(\text{mmol}/\text{L})=(\text{C 标准}\times\text{V2})\times(\text{A 测定}-\text{A 空白})\div(\text{A 标准}-\text{A 空白})\div\text{V1}\times\text{D}$$
$$=5.17\times(\text{A 测定}-\text{A 空白})\div(\text{A 标准}-\text{A 空白})\times\text{D}$$

C 标准---5.17mmol/L；

V1---样本加入体积，0.0025mL；

V---提取液体积，1mL；

500---细胞数量，万；

Mr=386.6---胆固醇分子量；

V2---标准品加入体积，0.0025mL；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

W---样本取样质量，g。