

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0412

Size: 100T/96S

总胆固醇 (TC) 检测试剂盒说明书

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

一、测定意义:

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。

二、测定原理:

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 H_2O_2 ; 最后利用过氧化物酶催化 H_2O_2 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。

三、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。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	异丙醇 100mL×1 瓶, 自备	4°C 保存	
工作液	液体 30mL×1 瓶	4°C 保存	
标准品	粉剂×1 支	4°C 保存	10mg 胆固醇, 临用前加入 517 μ L 提取液, 振荡溶解, 即为 50 μ mol/mL 的胆固醇标准溶液。

五、操作步骤：

● 样本处理：

1. 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°C 离心 10min, 取上清置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量 (10^4 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°C 离心 10min, 取上清置于冰上待测。
3. 血清 (浆) 样品：直接测定。

● 测定步骤：

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

	测定管	标准管	空白管
样品 (μL)	20	-	-
标准溶液 (μL)	-	20	-
提取液 (μL)	-	-	20
工作液 (μL)	180	180	180

充分混匀, 37°C 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。

六、总胆固醇含量计算

● 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 ($\mu\text{mol/mL}$)

● 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; $V_{\text{提取}}$: 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。

七、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。