

总胆固醇 (total cholesterol, TC) 含量测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

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

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；在 500nm 有特征吸收峰，其颜色深浅与 TC 含量成正比。

自备仪器和用品：

水浴锅、可调式移液枪、酶标仪、96 孔板。

试剂组成和配置：

试剂一：异丙醇 100mL (自备)；

试剂二：液体 20mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃ 保存；

试剂四：液体 40 μ L×1 瓶，4℃ 保存；

TC 标准品：液体 1mL×1 支，0.5 μ mol/mL，4℃ 保存。

TC 的提取：

- 1、组织中 TC 的提取：按照组织质量 (g)：试剂一体积 (mL) 为 1：5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一) 进行冰浴匀浆，8000g 4℃ 离心 10min，取上清，即 TC 待测液。
- 2、细胞、细菌中 TC 的提取：先收集 400-500 万细胞或细菌到离心管内，弃上清，加 1mL 试剂一，超声波破碎 1min (强度 20%，超声 2s，停 1s)，即 TC 待测液。
- 3、血清 (浆) 等样品：直接测定。

测定操作：

1. 酶标仪预热 30 min，调节波长到 500 nm。
2. **TC 工作液的配制：**临用前，吸取约 0.8mL 试剂二分别加入试剂三和试剂四瓶中，充分溶解后再全部转移回试剂二瓶中，充分混匀，TC 工作液置于 37℃ 水浴 10min。用不完的工作液 4℃ 保存一周。
3. 标准管：依次在 96 孔板中加入 20 μ L FC 标准液和 180 μ L TC 工作液，混匀，37℃ 静置 3h 后于 500nm 测定 A 标准管。
4. 测定管：依次在 96 孔板中加入 20 μ L FC 待测液和 180 μ L TC 工作液，混匀，37℃ 静置 3h 后于 500nm 测定 A 测定管。
5. 空白管：依次在 96 孔板中加入 20 μ L 试剂一和 180 μ L TC 工作液，混匀，37℃ 静置 3h 后于 500nm 测定 A 测定管。

注意：标准管和空白管只需测定一次。

计算公式：

1. 血清 (浆) 中 TC 含量计算：

$$\text{TC } (\mu\text{ mol/dL}) = \text{C 标准液} \times (\text{A 测定管}-\text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管}-\text{A 空白管}) \times 100 \\ = 50 \times (\text{A 测定管}-\text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管}-\text{A 空白管})$$

C 标准液: 0.5 $\mu\text{mol/mL}$; 100 mL: 1dL=100 mL。

2. 组织中 TC 含量计算:

(1)按样本蛋白浓度计算

$$\text{TC } (\mu\text{ mol / mg prot}) = \text{C 标准液} \times (\text{A 测定管}-\text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管}-\text{A 空白管}) \div \text{Cpr} \\ = 0.5 \times (\text{A 测定管}-\text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管}-\text{A 空白管}) \div \text{Cpr}$$

(2)按样本质量计算

$$\text{TC } (\mu\text{ mol / g 鲜重}) = \text{C 标准液} \times (\text{A 测定管}-\text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管}-\text{A 空白管}) \div \text{W} \\ = 0.5 \times (\text{A 测定管}-\text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管}-\text{A 空白管}) \div \text{W}$$

C 标准液: 0.5 $\mu\text{mol/mL}$; 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g/mL

3. 细胞、细菌中 TC 含量计算:

$$\text{TC } (\mu\text{ mol / } 10^4 \text{ cell}) = \text{C 标准液} \times (\text{A 测定管}-\text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管}-\text{A 空白管}) \div \text{细菌或细胞} \\ (\text{ } 10^4 \text{ cell / L})$$

$$= 0.5 \times (\text{A 测定管}-\text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管}-\text{A 空白管}) \div \text{细菌或细胞} (\text{ } 10^4$$

cell / L)

C 标准液: 0.5 $\mu\text{mol/mL}$ 。

最低检出限为 1nmol/mL。