

总胆固醇(TC)含量检测试剂盒说明书

Total Cholestenone Content Assay Kit

微量法

货号：AK259

规格：100T/96S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
AK259-提取液 (异丙醇)	100mL (自备)	4℃保存
AK259-A (工作液)	20mL×1 瓶	4℃避光保存
AK259-标准品	1mL×1 支	4℃避光保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介：

意义：总胆固醇 (TC) 是指血清中各种脂蛋白所含的胆固醇，即结合胆固醇和游离胆固醇的总和。血清中的胆固醇基本上是以结合状态存在于脂蛋白中，所以它主要代表结合的胆固醇，无法反映各种脂蛋白的多少，也就不能够确切地反映高密度脂蛋白胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇的多少。

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 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；在 500nm 有特征吸收峰，其颜色深浅与 TC 含量成正比。

自备用品：

可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、天平、水浴锅、离心机、可调式移液枪、蒸馏水、异丙醇。

总胆固醇提取：

1. 组织中 TC 的提取：按照组织质量 (g)：异丙醇体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 异丙醇）进行冰浴匀浆，10000g 4℃离心 10min，取上清置冰上待测。
2. 细胞、细菌中 TC 的提取：先收集 500 万细胞或细菌到离心管内，弃上清，加 1mL 异丙醇，超声波破碎 3min（功率 300w，超声 2s，停 3s），10000g 4℃离心 10min，取上清置冰上待测。
3. 血清（浆）等样品：直接测定。

测定步骤：

1. 可见分光光度计/酶标仪预热 30 min，调节波长到 500 nm，蒸馏水调零。
2. 按下表依次加入下列试剂：

试剂名称	标准管 (μl)	测定管 (μl)	空白管 (μl)
样本		20	
标准液	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， $\Delta A (A1) = A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}$ ， $\Delta A \text{ 标准} (A2) = A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}$ 。
注意：空白管只需测定 1-2 次。

TC 计算公式：

1. 血清（浆）中 TC 含量计算：

$$TC \text{ (mmol /L)} = A1 \div A2 \times C \text{ 标准液}$$

2. 组织、细胞中 TC 含量计算：

- (1) 按样本蛋白浓度计算

$$TC \text{ (mmol / g prot)} = A1 \div A2 \times C \text{ 标准液} \div Cpr$$

- (2) 按样本质量计算

$$TC \text{ (mmol / g 组织)} = A1 \div A2 \times C \text{ 标准液} \div W$$

C 标准液：5 mmol/L；样本蛋白浓度 Cpr, mg /mL；样本质量 W, g

注意事项：

1. 标准品为醇溶性试剂，易挥发，96 孔板操作时尽量在加完样本后加标准品，且标准孔优先加入工作液以降低标准品的挥发，从而降低偏差。
2. 试剂应防止葡萄糖、胆固醇等试剂的污染。
3. 用提取液提取后的上清不能用于蛋白浓度测定。如需测定蛋白浓度，需另取组织。