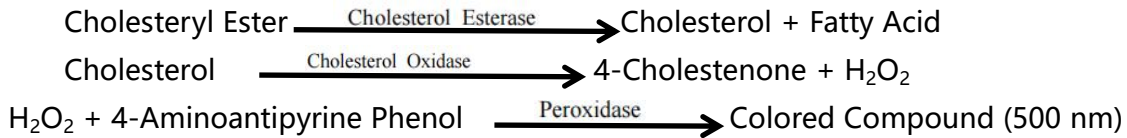


Total Cholesterol Assay Kit,总胆固醇(TC)含量检测试剂盒 微量法

产品简介

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 (Free Cholesterol, FC) 和胆固醇酯 (Cholesteryl Ester, CE)。本试剂盒的检测方法是微量法, 既可以用可见分光光度计检测, 也可以用酶标仪检测。该产品的最低检出限是 0.143 $\mu\text{mol/mL}$, 线性范围为 0.156-5 $\mu\text{mol/mL}$ 。

作用原理是通过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 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 500 nm 有特征吸收峰, 颜色深浅与 TC 含量成正比。作用方式如下:



测定总胆固醇(TC)请选择 60723ES 总胆固醇(TC)含量检测试剂盒; 测定游离胆固醇(FC)请选择 60724ES 游离胆固醇(FC)含量检测试剂盒。

产品信息

货号	60723ES60
规格	100 T

组分信息

组分编号	组分名称	规格	储存条件
60723-A	试剂一	30 mL	2~8°C
60723-B	试剂二	160 μL	2~8°C
60723-C	试剂三	25 μL	2~8°C
60723-D	标准品	10 mg	2~8°C

储存条件

2~8°C保存, 有效期 6 个月。

使用说明

【注意事项】实验之前建议选择 3 个预期差异大的样本做预实验, 如果样本吸光值不在测量范围内, 建议稀释或者增加样本量进行检测。

1. 需自备的仪器和溶剂:

可见分光光度计/酶标仪、天平、低温台式离心机、水浴锅/恒温培养箱、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、可调式移液枪、EP 管、蒸馏水和异丙醇。

2. 溶液的配制:

- 1) 自备提取液异丙醇：大约需要 110 mL，常温保存；试剂盒内提供一个 30 mL 棕色空瓶，仅做分装使用。
- 2) 标准品溶液的配制：10 mg 胆固醇使用前加入 517 μL 提取液，振荡溶解后即为 50 $\mu\text{mol/mL}$ 的胆固醇标准溶液，2~8°C 可保存 4 周。
- 3) 试剂三液体置于试剂瓶内 EP 管中。
- 4) 工作液的配制：根据样本量将试剂一、试剂二、试剂三按照 3 mL、20 μL 、3 μL 的比例配制工作液，约为 16 T，现用现配。

3. 操作步骤

1) 样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

- a. 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 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）进行冰浴匀浆。10000 g，4°C 离心 10 min，取上清置冰上待测。
- b. 细菌/细胞：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 1 mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300 w，超声 2 秒，间隔 3 秒，总时间 3 min）；然后 10000 g，4°C 离心 10 min，取上清置于冰上待测。
- c. 血清（浆）等液体样本：直接测定，若有沉淀请离心后取上清待测。

2) 测定步骤

- a. 可见分光光度计/酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 500 nm，分光光度计蒸馏水调零。
- b. 标准溶液的稀释：将 50 $\mu\text{mol/mL}$ 胆固醇标准溶液用提取液进行稀释，得到 2.5、2、1.25、0.625、0.3125、0.15625 $\mu\text{mol/mL}$ 的标准溶液备用。
- c. 标准溶液稀释可参考下表：

序号	稀释前浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)	标准溶液体积 (μL)	提取液体积 (μL)	稀释后浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)
1	50	50	950	2.5
2	2.5	800	200	2.0
3	2	625	375	1.25
4	1.25	500	500	0.625
5	0.625	500	500	0.3125
6	0.3125	500	500	0.15625

注：实验中每个标准管需 20 μL 标准溶液。

d. 在 1.5 mL EP 管/96 孔板按下表步骤加样

试剂名称 (μL)	测定管	标准管	空白管
样本	20	-	-
标准溶液	-	20	-
提取液	-	-	20
工作液	180	180	180

充分混匀，37°C 静置 15 min，反应完成后测定 500 nm 处吸光值 A，分别记为 A 测定、A 标准和 A 空白， ΔA 测定 = A 测定 - A 空白， ΔA 标准 = A 标准 - A 空白。空白管和标准曲线只需测 1-2 次。

注：若样本为血清，则空白管中的提取液（异丙醇）需要更换为蒸馏水进行实验。

3) 总胆固醇含量计算

a. 标准曲线的绘制：

根据标准管的浓度 (x , $\mu\text{mol/mL}$) 和吸光度 ΔA 标准 (y , ΔA 标准) , 建立标准曲线。根据标准曲线, 将 ΔA 测定 (y , ΔA 测定) 带入公式计算样本浓度 (x , $\mu\text{mol/mL}$) 。

b. 总胆固醇含量的计算：

(1) 按血清 (浆) 等液体体积计算: TC 含量 ($\mu\text{mol/dL}$) = $x \times 100$

(2) 按样本蛋白浓度计算: TC 含量 ($\mu\text{mol/mg prot}$) = $x \times V_{\text{提取}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{提取}}) = x \div C_{\text{pr}}$

(3) 按样本质量计算: TC 含量 ($\mu\text{mol/g 质量}$) = $x \times V_{\text{提取}} \div W = x \div W$

(4) 按细胞/细菌数量计算: TC 含量 ($\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}$) = $x \times V_{\text{提取}} \div 500 = 0.002x$

100: 单位换算系数, 1 dL=100 mL; $V_{\text{提取}}$: 加入样本的提取液体积, 1 mL; W : 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。

4. 实验实例：

取鼠血清样本, 直接按照测定步骤操作, 使用 96 孔板测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$

= $0.092 - 0.048 = 0.044$, 根据标准曲线 $y = 0.4331x - 0.0623$, 计算 $x = 0.2454$, 按血清 (浆) 等液体体积计算: TC 含量 ($\mu\text{mol/dL}$) = $x \times 100 = 0.2454 \times 100 = 24.54 \mu\text{mol/dL}$ 。

注意事项

1. 如果测定吸光值超过线性范围吸光值, 可以增加样本量或者用提取液稀释样本后再进行测定, 但注意同步修改计算公式。
2. 提取液中含有使蛋白变形的成分, 故按蛋白浓度计算时需要重新提取蛋白进行测定。
3. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
4. 本产品仅作科研用途!