

总胆固醇（total cholesterol, TC）含量测定试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

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：

可见分光光度计、水浴锅、可调式移液枪、1mL 玻璃比色皿、异丙醇和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：异丙醇 50mL（自备）。

试剂二：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃ 保存；

试剂四：液体 100 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. 分光光度计预热 30 min，调节波长到 500 nm，蒸馏水调零。
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 1mL 玻璃比色皿中加入 100 μ L FC 标准液和 900 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 1mL 玻璃比色皿中加入 100 μ L FC 待测液和 900 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 1mL 玻璃比色皿中加入 100 μ L 试剂一和 900 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：

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

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

2. 组织中 TC 含量：

(1)按样本蛋白浓度计算

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

(2)按样本质量计算

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

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：

$$\begin{aligned} \text{TC } (\mu\text{ mol}/10^4 \text{ cell}) &= \text{C 标准液} \times (\text{A 测定管}-\text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管}-\text{A 空白管}) \div \text{细菌或细胞 } (10^4 \text{ cell/L}) \\ &= 0.5 \times (\text{A 测定管}-\text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管}-\text{A 空白管}) \div \text{细菌或细胞 } (10^4 \text{ cell/L}) \end{aligned}$$

C 标准液：0.5 $\mu\text{mol/mL}$ 。

注意事项：

最低检出限为 1nmol/mL。