

总胆固醇（total cholesterol, TC）含量试剂盒说明书

（货号：ADS-F-ZF014 分光法 48 样）

一、产品简介：

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

利用酯酶催化胆固醇酯水解生成游离胆固醇（FC），FC 在胆固醇氧化酶作用下被氧化生成 4-胆甾烯酮和 H_2O_2 ；接着与 4-氨基氨替吡啶等反应生成红色醌类化合物，其在 510nm 处有特征吸收峰，通过检测 510nm 处吸光值即可得出 TC 含量。

二、试剂盒的组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	粉体 1 支	-20°C 保存	临用前加入 7.5ml 蒸馏水
试剂二	液体 28mL×1 瓶	4°C 保存	
标准品	粉体 1 支	4°C 保存	临用前加入 1mL 无水乙醇充分溶解，标准品浓度为 5.17mmol/L

三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、乙醇、可调式移液枪、水浴锅、离心机、研钵、蒸馏水。

四、总胆固醇（TC）含量测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：

称取约 0.1g 组织样本加入研钵中，加入 1mL 乙醇，进行冰浴匀浆，12000rpm，4°C 或室温离心 10min，取上清液待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液（mL）为 1：5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 乙醇，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4°C 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（ 10^4 ）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 液体样本：澄清的液体样本直接测定，若浑浊则离心后取上清检测。

2、上机检测：

① 紫外分光光度计预热 30 min，调节波长到 510 nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温（25°C），在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	标准管 （仅做一次）	空白管 （仅做一次）
样本	7		
标准品		7	
蒸馏水			7
试剂一	150	150	150
试剂二	550	550	550
混匀，37°C 孵育 10min，于 510nm 处读取各管吸光值 A。			

- 【注】1.若测定管的 A 值大于 1，则需将组织或细胞样本用乙醇进行稀释（若是液体样本如血清需用生理盐水或 PBS 或蒸馏水稀释），稀释倍数 D 需代入公式重新计算。
- 2.若 A 测定管值低于空白管，可增加样本加样体积 V1（如增至 15μL 或更多，则试剂一、试剂二保持不变，标准品仍为 7μL，额外加 8μL 蒸馏水补齐）；或增加样本取样质量 W（如增至 0.2g 或更多），则改变的 V1 和 W 则代入公式重新计算。
- 3.若样本自身颜色为红色，也可增设一个样本自身对照（即 7μL 样本+700μL 蒸馏水）；混匀，37℃孵育 10min，510nm 读取吸光值 A，（A 测定-A 对照）代入公式计算。

五、结果计算：

1、按样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{TC}(\mu\text{g/g 重量}) &= (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times \text{Mr} \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div (\text{W} \times \text{V1} \div \text{V}) \times \text{D} \\ &= 1998.7 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{W} \times \text{D} \end{aligned}$$

2、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{TC}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div (500 \times \text{V1} \div \text{V}) \times \text{D} \\ &= 4 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times \text{D} \end{aligned}$$

3、液体中 TC 含量计算：

$$\begin{aligned} \text{TC}(\mu\text{g/mL}) &= (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times \text{Mr} \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{V1} \times \text{D} \\ &= 1998.7 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times \text{D} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{TC}(\text{mmol/L}) &= (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{V1} \times \text{D} \\ &= 5.17 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times \text{D} \end{aligned}$$

C 标准---5.17mmol/L;

V1---样本加入体积，0.007mL;

V---提取液体积，1mL;

500---细胞数量，万;

Mr=386.6---胆固醇分子量;

V2---标准品加入体积，0.007mL;

D---稀释倍数，未稀释即为 1;

W---样本取样质量，g。