



总胆固醇（TC）含量检测试剂盒说明书

可见分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC1980

规格：50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	自备试剂	-
试剂一	液体 60 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 450 μL×1 支	2-8°C保存
试剂三	液体 70 μL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	粉剂×1 支	2-8°C保存

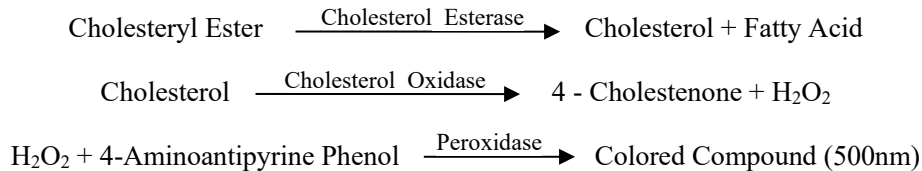
溶液的配制：

- 1、提取液：自备异丙醇，大约需要 60mL，常温保存；试剂盒内提供一个 30mL 棕色空瓶，仅做分装使用，请自行标注试剂名称。
- 2、标准品：10 mg 胆固醇，临用前加入 517 μL 提取液，振荡溶解，即为 50 μmol/mL 的胆固醇标准溶液，2-8°C可以保存 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 9mL：60μL：9μL（约 10T）的比例配制工作液，现用现配。

产品说明：

总胆固醇（Total Cholesterol, TC）是指所有脂蛋白所含胆固醇的总和，包括游离胆固醇和胆固醇酯。

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，其在500nm有特征吸收峰，其颜色深浅与TC含量成正比。



技术指标：

最低检出限：0.056 μmol/mL

线性范围：0.078-2 μmol/mL

注意：实验之前建议选择 2-3 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。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、天平、低温台式离心机、水浴锅/恒温培养箱、1mL玻璃比色皿、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、可调式移液枪、EP管、蒸馏水、异丙醇。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1.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 0.1g 组织，加入 1mL 提取液）进行冰浴匀浆。10000g，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。

2.细菌/细胞：按照细胞数量（10⁴个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 2 秒，间隔 3 秒，总时间 3min）；然后 10000g，4℃离心 10min，取上清置于冰上待测。

3.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。

二、测定步骤

1. 可见分光光度计预热30min以上，调节波长至500nm，蒸馏水调零。

2. 标准溶液的稀释：将50μmol/mL胆固醇标准溶液用提取液进行稀释得到2、1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078μmol/mL的标准溶液备用。

3. 标准溶液稀释可参考下表：

序号	稀释前浓度（μmol/mL）	标准溶液体积（μL）	提取液体积（μL）	稀释后浓度（μmol/mL）
1	50	40	960	2
2	2	625	375	1.25
3	1.25	500	500	0.625
4	0.625	500	500	0.3125
5	0.3125	500	500	0.15625
6	0.15625	500	500	0.078

备注：实验中每个标准管需100μL标准溶液。

4. 在1.5mLEP管按下表步骤加样：

试剂名称（μL）	测定管	标准管	空白管
样本	100	-	-
标准溶液	-	100	-
提取液	-	-	100
工作液	900	900	900

充分混匀，37℃静置 15min，反应完成后于 1mL 玻璃比色皿，测定 500nm 处吸光值 A，分别记为 A 测定、A 标准和 A 空白， $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{空白}$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白}$ 。空白管和标准曲线只需测 1-2 次。

注：若样本为血清，则需要增加‘血清空白管’-即将空白管中的提取液（异丙醇）更换为蒸馏水进行实验，计算 $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{血清空白}$ ，标准管测定及 $\Delta A_{标准}$ 计算不变。

三、总胆固醇含量计算

1. 标准曲线的绘制：

根据标准管的浓度（x，μmol/mL）和吸光度 $\Delta A_{标准}$ （y， $\Delta A_{标准}$ ），建立标准曲线。根据标准曲线，将 $\Delta A_{测定}$

测定 (y, ΔA测定) 带入公式计算样本浓度 (x, μmol/mL)。

2. 总胆固醇含量的计算:

- (1) 按血清(浆)等液体体积计算: TC含量(μmol/dL) = x × 100
- (2) 按样本蛋白浓度计算: TC含量(μmol/mg prot) = x × V_{提取} ÷ (C_{pr} × V_{提取}) = x ÷ C_{pr}
- (3) 按样本质量计算: TC含量(μmol/g 质量) = x × V_{提取} ÷ W = x ÷ W
- (4) 按细胞/细菌数量计算: TC含量(μmol/10⁴ cell) = x × V_{提取} ÷ N = x

100: 单位换算系数, 1dL=100mL; V_{提取}: 加入样本的提取液体积, 1mL; W: 样本质量, g; N: 细菌或细胞总数, 以万计。

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。注意同步修改计算公式。
2. 提取液中含有使蛋白变性的成分, 故按蛋白浓度计算时需要重新提取蛋白进行测定。

实验实例:

1、取鸡血浆样本, 直接按照测定步骤操作, 测得计算 ΔA=A_{测定}-A_{空白}=0.083-0.012=0.071, 根据标准曲线 y = 0.6686x-0.035, 计算 x=0.1585, 按血清(浆)等液体体积计算得:

TC 含量(μmol/dL) = x × 100 = 0.1585 × 100 = 15.85 μmol/dL。

相关发表文献:

[1] Qin Yuan, Shang Lin, Yuan Fu, et al. Effects of extraction methods on the physicochemical characteristics and biological activities of polysaccharides from okra (*Abelmoschus esculentus*). *International Journal of Biological Macromolecules*. April 2019; 127:178-186. (IF4.784)

[2] Wei Hu, Rui Wei, Li Yue Wang, et al. Correlations of MMP-1, MMP-3, and MMP-12 with the degree of atherosclerosis, plaque stability and cardiovascular and cerebrovascular events. *EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE*. 2018;(IF1.448)

[3] Jieyong Xing, Yanshao Liu, Tao Chen, et al. Correlations of chemokine CXCL16 and TNF-α with coronary atherosclerotic heart disease. *Experimental and Therapeutic Medicine*. November 2017;(IF1.448)

[4] Jiabin Huang, Shangjun Chen, Dongliang, et al. Long noncoding RNA lncARSR promotes hepatic cholesterol biosynthesis via modulating Akt/SREBP-2/HMGCR pathway. *Life Sciences*. June 2018;(IF3.448)

[5] Li W, Li Y, Zhao Y, et al. The protective effects of alopentine against ox-LDL-induced endothelial dysfunction and inflammation in HUVECs[J]. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2020, 48(1): 107-115.

相关系列产品:

- BC1890/BC1895 游离胆固醇(FC)含量检测试剂盒
- BC0590/BC0595 游离脂肪酸(FFA)含量检测试剂盒
- BC0750/BC0755 乙醛脱氢酶(ALDH)活性检测试剂盒