

**总胆固醇（total cholesterol, TC）含量测定试剂盒说明书**

微量法 100T/96S

**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 $\Delta^4$ -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：**

水浴锅、可调式移液枪、酶标仪、96孔板。

**试剂组成和配置：**

试剂一：异丙醇100mL（自备）；

试剂二：液体20mL×1瓶，4℃保存；

试剂三：粉剂×1瓶，4℃保存；

试剂四：液体40 $\mu$ L×1瓶，4℃保存；

TC标准品：液体1mL×1支，0.5 $\mu$ 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，超声波破碎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. 酶标仪预热30 min，调节波长到500 nm。
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96孔板中加入20 $\mu$ L FC标准液和180 $\mu$ 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96孔板中加入20 $\mu$ L FC待测液和180 $\mu$ L LTC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96孔板中加入20 $\mu$ L 试剂一和180 $\mu$ L LTC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含量计算:

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

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

#### 2. 组织中TC含量计算:

##### (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

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

C标准液: 0.5 $\mu$ mol/mL; 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g/mL

#### 3. 细胞、细菌中TC含量计算:

$$\begin{aligned} \text{TC } (\mu \text{ mol}/104 \text{ cell}) &= \text{C标准液} \times (\text{A测定管}-\text{A空白管}) \div (\text{A标准管}-\text{A空白管}) \div \text{细菌或细胞 } (104 \text{ cell/L}) \\ &= 0.5 \times (\text{A测定管}-\text{A空白管}) \div (\text{A标准管}-\text{A空白管}) \div \text{细菌或细胞 } (104 \text{ cell/L}) \end{aligned}$$

C标准液: 0.5 $\mu$ mol/mL。

最低检出限为1nmol/mL。