

总胆固醇(T-CHO)测试盒说明书(精简版)

(货号:A111-2-1 分光光度法)

一、试剂组成及配制:

试剂组成	规格	组 份	浓 度	保存条件
工作液 (酶剂)	100mL×1 瓶	Good's 缓冲液	50mmol/L, pH6.7	2~8℃ 避光
		苯酚	5mmol/L	
		4-AAP	0.3mmol/L	
		胆固醇酯酶	≥50KU/L	
		胆固醇氧化酶	≥25KU/L	
		过氧化物酶	≥1.3KU/L	
		牛血清白蛋白	1g/L	
校准品	1 支	叠氮钠	1g/L	
		胆固醇	见标签	

二、测定原理:

胆固醇酯 $\xrightarrow{CE}$ 胆固醇 + 脂肪酸
 $胆固醇 + O_2 \xrightarrow{CO} \Delta^4 - 胆固醇烯酮 + H_2O_2$
 $H_2O_2 + 4 - AAP + 苯酚 \xrightarrow{POD} 红色 醌 化 物 + H_2O$
生成的醌类化合物颜色的深浅与胆固醇的含量成正比，
分别测定校准管和样本管的吸光度值，计算胆固醇的含量。

三、所需仪器耗材及试剂:

含 500nm 波长的分光光度计及 1cm 光径比色皿(或酶标仪及 96 孔板), 37℃水浴锅, 台式低速离心机, 各种规格移液器, 蒸馏水, 涡旋混匀器, 试管或离心管。

四、操作过程:

1、样本处理:

- ①、血清(浆): 直接测定, 如超过线性范围用生理盐水稀释后测定。
- ②、培养液样本: 吸取培养液, 1000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清测定。[注]: 一般建议细胞密度在 100 万个/mL 以上。
- ③、组织样本: 准确称取组织重量, 按重量(g): 体积(mL)=1:9 的比例, 加入 9 倍体积的匀浆介质, 冰水浴条件下机械匀浆, 2500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液待测。[注]: 如组织样本均为非高脂样本, 匀浆介质统一用磷酸盐缓冲液(0.1mol/L pH 7.4)或生理盐水进行匀浆提取; 如组织样本均为高脂样本或部分为高脂样本, 匀浆介质可统一用无水乙醇进行匀浆提取。
- ④、细胞样本:
 - A、细胞收集: 将制备好的细胞悬液取出, 1000 转/分, 离心 10 分钟, 弃上清液, 留细胞沉淀; 用等渗缓冲液(推荐 0.1mol/L、pH7~7.4 磷酸盐缓冲液)清洗 1~2 次, 同样 1000 转/分, 离心 10 分钟, 弃上清液, 留细胞沉淀;
 - B、细胞破碎: 加入 0.2~0.3mL 的匀浆介质(推荐 0.1mol/L、pH7~7.4 磷酸盐缓冲液或生理盐水)进行匀浆, 冰水浴条件下超声破碎(功率 300W, 3~5 秒/次, 间隔 30 秒, 重复 3~5 次)或手动匀浆, 制备好的匀浆液不离心直接测定。也可采用裂解液裂解(推荐 TritonX-100, 1~2%, 裂解 30~40 分钟), 裂解好的液体不离心直接测定。

[注]: 建议收集的细胞密度在 100 万个/mL 以上。破碎好的液体可显微镜观察细胞是否破碎完全。

2、操作表:

	空白管	校准管	样本管
蒸馏水 (μL)	10		
校准品 (μL)		10	
样本 (μL)			10
工作液 (μL)	1000	1000	1000

混匀, 37℃孵育 10 分钟, 波长 500nm, 测定

各管吸光度值

四、计算公式:

1、血清等液体样本计算公式:

$$胆固醇含量 (mmol/L) = \frac{A_{样本} - A_{空白}}{A_{标准} - A_{空白}} \times C_{标准}$$

C_{标准}: 标准品浓度, mmol/L (具体浓度见标签)。

2、组织、细胞计算公式:

①、用 PBS 或生理盐水作匀浆介质提取样本计算方法 (此方法需要另外测定匀浆液蛋白浓度):

$$胆固醇含量 (mmol/gprot) = \frac{A_{样本} - A_{空白}}{A_{标准} - A_{空白}} \times C_{标准} \div Cpr$$

C_{标准}: 标准品浓度, mmol/L (具体浓度见标签)。

Cpr: 匀浆液蛋白浓度, gprot/L (prot 指蛋白)。

注: 本所有售蛋白测定试剂盒(货号为 A045-2 或 A045-3/-4)。

②、用无水乙醇作匀浆介质提取样本计算方法 (此方法不需要另外测定匀浆液蛋白浓度):

$$胆固醇含量 (mmol/g组织) = \frac{A_{样本} - A_{空白}}{A_{校准} - A_{空白}} \times C_{标准} \div \frac{W}{V_{乙醇}}$$

W: 样本质量, g; V_{乙醇}: 加入的乙醇的总体积, L。

注: 如样本中含有高脂样本, 建议用乙醇来提取。细胞样本

测定时可得上式中 $\frac{W}{V_{乙醇}}$ 替换为细胞前处理时的细胞密

度。

五、性能指标:

- 1、试剂空白管吸光度≤0.100 (光径 0.5cm)。
- 2、线性: 0~19.39mmol/L 范围内, r²>0.995。
- 3、精密性: CV≤3%, 批间相对极差≤5%。
- 4、稳定性: 原装试剂盒在 2℃~8℃避光保存, 有效期为 12 个月。开启后 2℃~8℃避光保存, 可稳定 3 个月。

六、注意事项:

- 1、本产品仅用于科研, 不得用于临床诊断, 切勿服用。
- 2、样品含量如超出检测范围上限时, 可用生理盐水稀释样本后进行测定, 测定结果乘以稀释倍数。
- 3、试剂防止葡萄糖、胆固醇等试剂的污染。
- 4、试剂与样本量可按照全自动生化分析仪的要求, 按照 1:100 的比例增减。
- 5、标准品为醇溶性试剂, 打开后易挥发, 96 管板操作时尽量在加完样本后加标准品, 且标准管优先加入工作液以降低标准品的挥发, 从而降低偏差。

七、参考文献:

- 1、Searay R. L. Diagnostic Biochemistry. Mc Graw-Hill . New York. NY. 1969
- 2、Richmand W. Clin. Chem. 1973; 19: 1350