

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 75 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 500 μL×1 支	2-8℃保存
试剂三	液体 75 μL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存

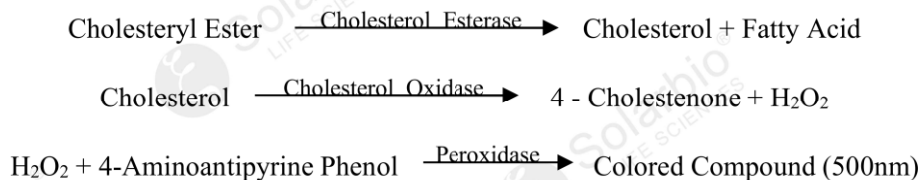
溶液的配制：

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. 试剂三：液体置于试剂瓶内 EP 管中，使用前用掌上离心机将液体甩离至底部。
3. 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 的胆固醇标准品，2-8℃可保存 4 周。
4. 工作液的配制：根据样本量按试剂一：试剂二：试剂三=3mL：20μL：3μL（共 3.023mL，约 3T）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：0.012 μmol/mL

线性范围：0.015-12.5 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、冰、蒸馏水、异丙醇（AR，98%）。

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：按照细菌/细胞数量（10⁶个）：提取液体积（mL）为 5~10：1 的比例（建议 10×10⁶ 万细菌/细胞加入 0.5mL 提取液），冰浴超声波破碎细菌/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. 工作液临用前37℃预热10min以上。
3. 标准品的稀释：将50μmol/mL胆固醇标准品用提取液进行稀释得到12.5、10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0.156μmol/mL的标准品备用。
4. 标准品稀释可参考下表：

序号	稀释前浓度（μmol/mL）	标准品体积（μL）	提取液体积（μL）	稀释后浓度（μmol/mL）
1	50	50	150	12.5
2	50	50	200	10
4	10	100	100	5
5	5	100	100	2.5
6	2.5	100	100	1.25
7	1.25	100	100	0.625
8	0.625	100	100	0.3125
9	0.3125	100	100	0.156

备注：下述实验中每个标准管需20μL标准品（注意不要在此步骤直接检测吸光度）。

5. 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	20	-	-
标准品	-	20	-
提取液	-	-	20
工作液	1000	1000	1000

充分混匀，37℃静置 30min，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，ΔA 测定=A 测定-A 空白，ΔA 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（浆）等液体样本，则需要增加‘血清（浆）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ΔA 测定=A 测定-A 血清（浆）空白，标准管测定及ΔA 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 , $\mu\text{mol/mL}$) 和吸光度 ΔA 标准 (y , ΔA 标准), 建立标准曲线。根据标准曲线, 将 ΔA 测定 (y , ΔA 测定) 带入公式计算样本浓度 (x , $\mu\text{mol/mL}$)。

2. 总胆固醇含量的计算:

(1) 按血清 (浆) 等液体体积计算: $\text{TC 含量 } (\mu\text{mol/dL}) = x \times 100 \times F$

(2) 按样本蛋白浓度计算: $\text{TC 含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) = x \times V_{\text{提取}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{提取}}) \times F = x \div C_{\text{pr}} \times F$

(3) 按样本质量计算: $\text{TC 含量 } (\mu\text{mol/g 质量}) = x \times V_{\text{提取}} \div W \times F = x \div W \times F$

(4) 按细胞/细菌数量计算: $\text{TC 含量 } (\mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}) = x \times V_{\text{提取}} \div N \times F = x \div N \times F$

100: 单位换算系数, $1\text{dL}=100\text{mL}$; $V_{\text{提取}}$: 加入样本的提取液体积, 1mL ; W : 样本质量, g ; N : 细胞/细菌总数, 以 10^6 计; C_{pr} : 蛋白浓度, mg/mL ; F : 样本稀释倍数。

注意事项:

- 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 (血清 (浆) 用蒸馏水稀释) 后再进行测定。注意同步修改计算公式。
- 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。
- 若细胞测定数值较小, 可修改样本量和工作液的比例, 如改为 $40+980$ (稀释倍速为 0.5)、 $100+920$ (稀释倍数为 0.2) 或者样本量提至更高体积。

实验实例:

- 取 0.105g 大鼠肾脏加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆, 按照测定步骤操作, 使用 1mL 玻璃比色皿测得 ΔA 测定 = A 测定 - A 空白 = $0.129 - 0.022 = 0.107$, 根据标准曲线 $y = 0.1036x - 0.0167$, $R^2 = 0.9990$, 计算 $x = 1.194$, 按样本质量计算含量得:

$\text{TC 含量 } (\mu\text{mol/g 质量}) = x \div W \times F = 11.372 \mu\text{mol/g 质量}$ 。

- 取 10×10^6 个 HeLa 细胞加入 0.5mL 提取液进行超声破碎, 按照测定步骤操作, 用 1mL 玻璃比色皿测得 ΔA 测定 = A 测定 - A 空白 = $0.066 - 0.022 = 0.044$, 根据标准曲线 $y = 0.1036x - 0.0167$, $R^2 = 0.9990$, 计算 $x = 0.586$, 按细胞数量计算含量得:

$\text{TC 含量 } (\mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}) = x \times V_{\text{提取}} \div N \times F = 0.029 \mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}$ 。

- 取大鼠血清样本, 直接按照测定步骤操作, 使用 1mL 玻璃比色皿测得 ΔA 测定 = A 测定 - A 空白 = $0.213 - 0.022 = 0.191$, 根据标准曲线 $y = 0.1036x - 0.0167$, $R^2 = 0.9990$, 计算 $x = 2.005$, 按血清 (浆) 等液体体积计算含量得:
 $\text{TC 含量 } (\mu\text{mol/dL}) = x \times 100 \times F = 200.5 \mu\text{mol/dL}$

相关发表文献:

[1] Luo Y, Chen Q, Zou J, Fan J, Li Y, Luo Z. Chronic Intermittent Hypoxia Exposure Alternative to Exercise Alleviates High-Fat-Diet-Induced Obesity and Fatty Liver. *Int J Mol Sci.* 2022 May 6;23(9):5209. doi: 10.3390/ijms23095209. PMID: 35563600; PMCID: PMC9104027.

[2] Xiong S, Yu S, Wang K, Xiong X, Xia M, Zeng G, Huang Q. Dietary Apigenin Relieves Body Weight and Glycolipid Metabolic Disturbance via Pro-Browning of White Adipose Mediated by Autophagy Inhibition. *Mol Nutr Food Res.* 2023 Sep;67(18):e2200763. doi: 10.1002/mnfr.202200763. Epub 2023 Jul 12. PMID: 37436078.





[3] Chen X, Zhao C, Xu Y, Huang K, Wang Y, Wang X, Zhou X, Pang W, Yang G, Yu T. Adipose-specific BMP and activin membrane-bound inhibitor (BAMBI) deletion promotes adipogenesis by accelerating ROS production. J Biol Chem. 2021 Jan-Jun;296:100037. doi: 10.1074/jbc.RA120.014793. Epub 2020 Nov 23. PMID: 33158991; PMCID: PMC7949090.

[4] Rong J, Li C, Zhang Q, Zheng G, Fan W, Pan Z, Shi S. Hydroxysafflor yellow A inhibits endothelial cell ferroptosis in diabetic atherosclerosis mice by regulating miR-429/SLC7A11. Pharm Biol. 2023 Dec;61(1):404-415. doi: 10.1080/13880209.2023.2225543. PMID: 37410531; PMCID: PMC10327525.

[5] Zuo J, Guo S, Qin X. Bisdemethoxycurcumin suppresses the progression of atherosclerosis and VSMC-derived foam cell formation by promoting lipophagy. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2023 Dec;396(12):3659-3670. doi: 10.1007/s00210-023-02558-7. Epub 2023 Jun 8. PMID: 37289282.

参考文献:

[1] Rautela GS, Liedtke RJ. Automated enzymic measurement of total cholesterol in serum[J]. Clinical Chemistry, 1978, 24(1): 108-114.

[2] Otani T, Ishimaru K, Nakamura S. et al. Determination of total and free cholesterol by using cholesterol oxidase from Streptomyces [J]. Chemical & pharmaceutical bulletin, 1977, 25(6): 1452-1455.

相关产品:

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

