

总胆固醇测定试剂盒(氧化酶法, 单试剂法)

微板法

本试剂盒仅供体外研究使用, 不用于临床诊断

使 用 说 明 书

货号: BP10474W

有效期: 6个月

规格: 48T(46S)/96T(94S)

保存温度: 2-8°C/-20°C

实验原理：

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 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 ESPAS，生成蓝紫色醌亚胺化合物，其在 546nm 有特征吸收峰，其颜色深浅与 TC 含量成正比。

检测范围：0.3-10mmol/L 灵敏度：0.3mmol/L

注意事项：

1. 不能使用过期产品，不同货号 and 批号组分不得混用。
2. 本试剂开封后请尽快使用，以免空气、采样污染引起试剂变质。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。试剂若不慎溅到人体表面，必须清水冲洗。
4. 如果可能传播疾病，所有的样品都应管理好，按照规定的程序处理样品和检测装置。
5. 试剂严格按保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。试剂盒中如有提供粉剂，使用前请甩几下，使粉剂落入底部。

产品组成:

试剂名称	规格 (48T/46S)	规格 (96T/94S)	保存条件
试剂一	15mL×1 瓶	30mL×1 瓶	2-8°C, 避光
标准品	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20°C, 避光

所需仪器耗材及试剂:

离心机、酶标仪、96 孔板、可调式移液器、无水乙醇、水浴锅、生理盐水。

样本处理及要求:

- 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围**，建议实验前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.3-10mmol/L，如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩(用对应的匀浆介质)。
- 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议做预实验验证其检测有效性。
- 血清(浆)等液体样本**：直接测定。若浑浊，离心后取上清测定。
- 培养液样本**：吸取培养液，10000 g，离心 10 分钟，取上清测定，一般建议细胞密度在 100 万个/mL 以上。
- 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，10000 g，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 pH7.4)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。

6. 细胞样本：

(1) 细胞收集:将制备好的细胞悬液取出，10000 g，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 10000 g，离心 10 分钟，弃上清液，留细胞沉淀；

(2) 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 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。

检测前准备工作:

1. 请提前取出试剂盒，平衡至室温。
2. **标准品溶液配制**：向标准品中加入 1mL 无水乙醇，即为标准品母液（10.354mmol/L）。取 200 μ L 标准品母液和 200 μ L 无水乙醇混合配制成 5.177mmol/L 的标准溶液，2-8 $^{\circ}$ C可保存 2~3 天。

操作步骤:

1. 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 546nm。
2. 样本测定（在 EP 管中依次加入）：

试剂名称(μ L)	标准管	测定管	空白管
试剂一	300	300	300
5.177mmol/L 标准品	3		
待测液		3	
蒸馏水			3

振荡混匀，37 $^{\circ}$ C水浴 5min 后再充分混匀，取 200 μ L 上清液加入 96 孔板中，在 546nm 处测定各管 OD 值。

注：标准管和空白管只需测定 1-2 管。

实验结果结算：

1. 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）：

$$\text{胆固醇}(\text{mmol/g prot}) = C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$

(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）：

$$\text{胆固醇}(\text{mmol/g 组织}) = C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div (W \div V_{\text{乙醇}})$$

2. 血清等液体样本计算公式

$$\text{胆固醇}(\text{mmol/L}) = C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}}$$

注：

$\Delta A_{\text{标准}}$ ：标准品 OD 值-空白管 OD 值 $\Delta A_{\text{测定}}$ ：测定管 OD 值-空白管 OD 值

N：样本稀释倍数

$V_{\text{乙醇}}$ ：加入乙醇体积，L

$C_{\text{标}}$ ：5.177mol/L

W：样品质量，g

C_{pr} ：匀浆液蛋白浓度，g prot/L

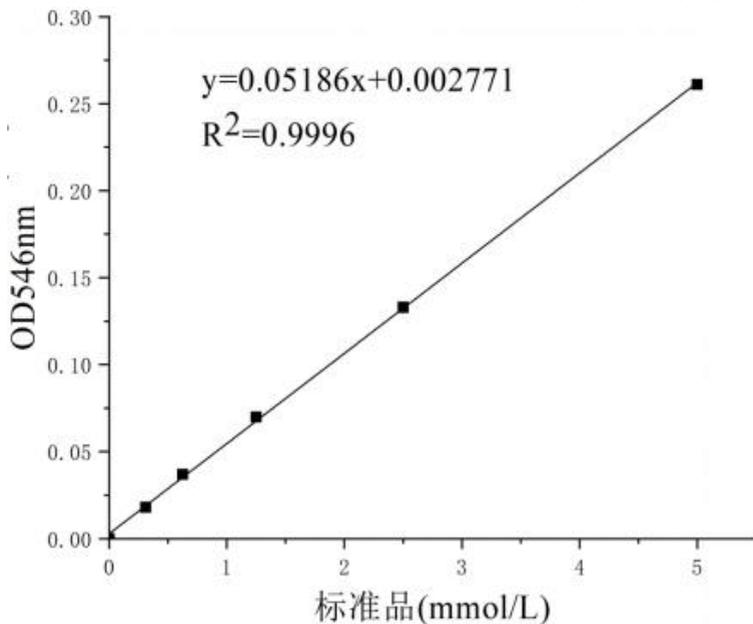
参考样本数据:

以下数据仅供参考:

样本类型	稀释倍数	参考值
大鼠血清	不稀释	2.174mmol/L
小鼠血清	不稀释	3.454mmol/L
大鼠肝脏 (10%匀浆)	不稀释	0.0031mmol/g
小鼠肝脏 (10%匀浆)	不稀释	0.0063mmol/g

参考曲线:

$y=0.05186x+0.002771, R^2=0.9996$, x 是标准品的浓度 (mmol/L), y 是 ΔA 。



注意: 标准曲线仅供参考, 用户不用制作。