

# 总胆固醇测定(氧化酶法, 单试剂法) 检测试剂盒微板法

## 使用说明书

产品货号: BP10474W

注意: 请在试剂盒保质期内使用, 具体保质期见外包装标签。

本产品仅供科学研究使用, 不能用于临床诊断。

检测范围: 0.3-10mmol/L

灵敏度: 0.3mmol/L

有效期: 6个月

保存温度: 2-8℃和-20℃

## 检测原理:

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。

## 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。

## 试剂盒组分：

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℃，避光
标准品	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃，避光

## 所需仪器耗材及试剂：

离心机、酶标仪、可调式移液器、无水乙醇、水浴锅、生理盐水。

## 样本处理及要求:

1. **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)。
2. 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。
3. **血清(浆)等液体样本**: 直接测定。若浑浊, 离心后取上清测定。
4. **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。
5. **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/LpH7.4)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  $\mu$  L 标准品母液和 200  $\mu$  L 无水乙醇混合配制成 5.177mmol/L 的标准溶液，2-8℃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( $\mu$ 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°C 水浴 5min 后再充分混匀, 取 200  $\mu$  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

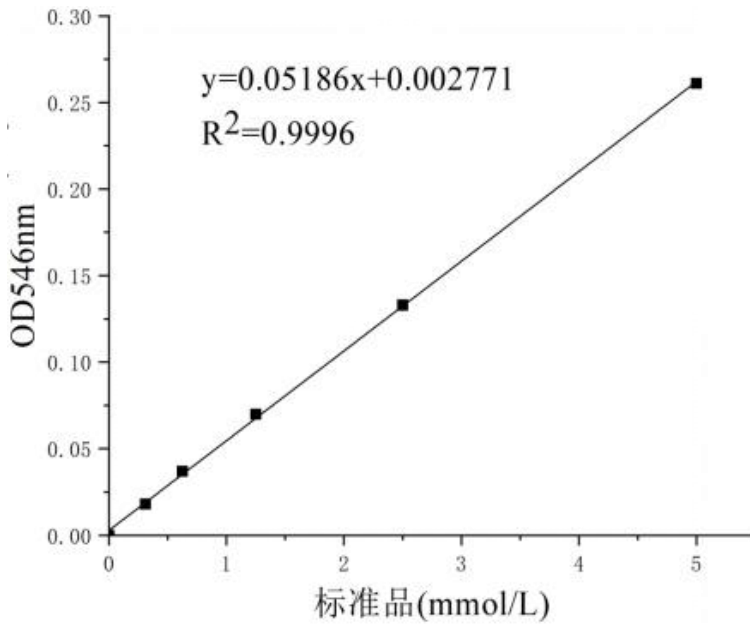
$C_{\text{标}}$ ：5.177mol/L

W：样品质量，g

Cpr：匀浆液蛋白浓度，g prot/L

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 $\Delta A$ 。



注意：标准曲线仅供参考，用户不用制作。