**总胆固醇(TC)测定试剂盒说明书（货号：PYB2043,规格：96T）**

1. **实验原理：**生成的醌类化合物颜色的深浅与胆固醇的含量成正比，分别测定校标准管和样本管的吸光度值，计算胆固醇的含量。 胆固醇脂 胆固醇+脂肪酸 ，胆固醇+O2 =△4 –胆甾烯酮+H2O2

POD

CO

CE

H2O2+4-AAp+苯酚 红色醌化物+ H2O

1. **试剂组份**：

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **试剂组成** | **规格** | **组份** | **浓度** | **保存** |
| 工作液（酶剂） | 25mL×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 |
| 叠氮钠 | 1g/L |
| 校准品 | 1支 | 胆固醇 | 见标签 |
| 附送96孔平底酶标板一块 | | | | 室温放置 |

所需仪器耗材及试剂：

含 500nm 波长的酶标仪及 96 孔板， 37℃水浴锅或恒温箱，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

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、精密度： 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。

1. **使用步骤：**

**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/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。

④、细胞样本：

1. 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。

操作表：

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 空白孔 | 标准孔 | 样本孔 | 混匀，37℃孵育10分钟，  波长500nm，酶标仪测定  各孔吸光度值 |
| 蒸馏水（ul） | 2.5 |  |  |
| 校准品（ul） |  | 2.5 |  |
| 样本（ul） |  |  | 2.5 |
| 工作液（ul） | 250 | 250 | 250 |

血清等液体样本计算公式**:**

A样本—A空白

A标准—A空白

胆固醇含量（mmol/L）**=** ×C标准

W：样本质量，g；V乙醇：加入的乙醇的总体积，L。

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）：

A标准—A空白

A样本—A空白

胆固醇含量（mmol/gprot）= ×C标准÷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

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）：

W

A样本—A空白

胆固醇含量（mmol/g组织）= ×C标准÷

V乙醇

A标准—A空白

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。细胞样本测定时可将上式中W/V乙醇替换为细胞前处理时的细胞密度。

1. **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孔板操作时尽量在加完样本后加标准品，且标准孔优先加入工作液以降低标准品的挥发，从而降低偏差。

参考文献：

1、Searay R .L.Diagonstic Biochemistry. Mc Graw-Hill . New York. NY.1969

2、 Richmand W.Clin.Chem.1973;19:1350