

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号：GBQ020

产品规格：48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器：荧光酶标仪(激发波长 535 nm，发射波长 590 nm)

Elabscience®总胆固醇和胆固醇酯荧光测定试剂盒

Total Cholesterol And Cholesteryl Ester

Fluorometric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清(浆)、动物组织、细胞样本中的总胆固醇及胆固醇酯的含量。

检测原理

总胆固醇(Total Cholesterol, TC)包括游离胆固醇(Free cholesterol, FC)和胆固醇酯(cholesteryl esters, CE)。胆固醇酯可被胆固醇酯酶(cholesterol esterase, CE)水解成胆固醇和游离脂肪酸，胆固醇在胆固醇氧化酶(cholesterol oxidase, CO)的氧化作用下生成 Δ^4 -胆甾烯酮和过氧化氢。过氧化氢在酶和探针的存在下反应，产生的荧光物质在激发波长 535 nm 和发射波长 590 nm 处的荧光强度与胆固醇浓度成正比。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	30 mL×1 瓶	60 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	0.06 mL×1 支	0.12 mL×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	酶试剂 1 (Enzyme Reagent 1)	0.3 mL×1 支	0.3 mL×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	酶试剂 2 (Enzyme Reagent 2)	0.3 mL×1 支	0.3 mL×1 支	-20℃ 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	5.17 mmol/L 胆固醇标准品 (5.17 mmol/L Cholesterol Standard Solution)	0.2 mL×1 支	0.2 mL×1 支	-20℃ 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	提取液 (Extracting Solution)	30 mL×1 瓶	60 mL×1 瓶	-20℃ 避光 保存 6 个月
	96 孔黑色酶标板	1 板		无要求
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，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。
本试剂盒规格 1 只测定总胆固醇或游离胆固醇时，可以测定 32 样，若测定胆固醇酯可测定 8 样；规格 2 只测定总胆固醇或游离胆固醇时，可测定 80 样，若测定胆固醇酯可测定 32 样

所需自备物品

仪器：荧光酶标仪(激发波长 535 nm，发射波长 590 nm)

试剂准备

① 检测前，试剂平衡至室温。

② 50 $\mu\text{mol/L}$ 胆固醇标准品的配制：

按试剂五：试剂一= 5: 512的比例配制，混匀，即为 50 $\mu\text{mol/L}$ 胆固醇标准品。

③ 显色剂1的配制(用于检测总胆固醇的)：

按试剂一：试剂二：试剂三：试剂四=45: 1: 2: 2的比例配制，混匀，现用现配，按需配制。

④ 显色剂2的配制(用于检测游离胆固醇)：

按试剂一：试剂二：试剂三=47: 1: 2的比例配制，混匀，现用现配，按需配制。

⑤ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度($\mu\text{mol/L}$)	0	2	5	10	15	20	25	30
50 $\mu\text{mol/L}$ 标准品(μL)	0	20	50	100	150	200	250	300
试剂一(μL)	500	480	450	400	350	300	250	200

样本准备

① 样本处理

组织样本：常规匀浆处理(匀浆介质为试剂六)。

细胞样本的处理

悬浮细胞：

4℃，1000 × g 离心 10 min 收集细胞，按照 10⁶ 个细胞加入 200-400 μL 试剂六，混匀 5 s 后，放置在冰上裂解 10 min，4℃，10000 × g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。若不能当天检测，细胞于-80℃ 保存，可保存一个月。

贴壁细胞：

吸弃培养液，用 PBS(0.01 M, pH 7.4)将细胞洗一遍。用细胞刮刮下细胞，加入 2-5 mL PBS(0.01 M, pH 7.4)，收集细胞悬液，后处理方法见悬液细胞处理方法。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.12-30 μmol/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
人血清	100-300	10%大鼠肝组织匀浆	50-150
大鼠血清	100-300	10%小鼠肾组织匀浆	50-200
小鼠血浆	100-300	10%大鼠脑组织匀浆	200-400
兔血清	100-300	10%大鼠脾组织匀浆	50-200
Jukat 细胞	不稀释		

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

- ① 试剂二，试剂三及试剂四避免反复冻融，可分装后-20℃保存。
- ② 显色剂制完成后，必须避光。
- ③ 检测前，试剂五需要完全溶解，可 65℃放置 30min 左右使之变澄清。

操作步骤

总胆固醇测定

- ① 标准孔：取 50 μL 不同浓度的标准品加入到对应酶标板孔中。
测定孔：取 50 μL 待测样本加入到对应酶标板孔中。
- ② 向步骤①中的标准孔、测定孔加入 50 μL 显色剂 1。
- ③ 酶标仪振板 10 s， 37℃ 避光孵育 10 min。
- ④ 荧光酶标仪上设置激发波长 535 nm，发射波长 590 nm，测定各孔荧光值。

游离胆固醇测定

- ① 标准孔：取 50 μL 不同浓度的标准品加入到对应酶标板孔中。
测定孔：取 50 μL 待测样本加入到对应酶标板孔中。
- ② 向步骤①中的标准孔、测定孔加入 50 μL 显色剂 2。
- ③ 酶标仪振板 10 s， 37℃ 避光孵育 10 min。
- ④ 荧光酶标仪上设置激发波长 535 nm，发射波长 590 nm，测定各孔荧光值。

操作表

总胆固醇测定

	标准孔	测定孔
不同浓度的标准品(μL)	50	--
待测样本(μL)	--	50
显色剂 1(μL)	50	50
酶标仪振板 10 s, 37℃ 避光孵育 10 min, 荧光酶标仪上设置激发波长 535 nm, 发射波长 590 nm, 测定各孔荧光值。		

游离胆固醇测定

	标准孔	测定孔
不同浓度的标准品(μL)	50	--
待测样本(μL)	--	50
显色剂 2(μL)	50	50
酶标仪振板 10 s, 37℃ 避光孵育 10 min, 荧光酶标仪上设置激发波长 535 nm, 发射波长 590 nm, 测定各孔荧光值。		

结果计算

样本总胆固醇含量计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

血清(浆)总胆固醇的计算:

$$\begin{aligned} \text{总胆固醇含量} &= (\Delta F - b) \div a \times f \\ (\mu\text{mol/L}) \end{aligned}$$

组织、细胞中总胆固醇的计算:

$$\begin{aligned} \text{总胆固醇含量} &= (\Delta F_1 - b) \div a \times f \div C_{pr} \\ (\mu\text{mol/gprot}) \end{aligned}$$

注解:

y: 标准品的绝对荧光值(标准孔荧光值-空白荧光值, 空白荧光值是标准品浓度为 0 时的荧光值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔF : 血清(浆)样本的绝对荧光值(测定孔荧光值-空白荧光值)

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

ΔF_1 : 组织或细胞样本的绝对荧光值(测定孔荧光值-空白荧光值)

C_{pr} : 样本的蛋白浓度 mgprot/mL

样本游离胆固醇含量计算

标准品拟合曲线: $y = a_1x + b_1$

血清(浆)游离胆固醇的计算:

$$\text{游离胆固醇含量} = (\Delta F_2 - b_1) \div a_1 \times f$$

($\mu\text{mol/L}$)

组织、细胞中游离胆固醇的计算:

$$\text{游离胆固醇含量} = (\Delta F_3 - b_1) \div a_1 \times f \div C_{pr}$$

($\mu\text{mol/gprot}$)

注解:

y: 标准品的绝对荧光值(标准孔荧光值-空白荧光值, 空白荧光值是标准品浓度为 0 时的荧光值)

x: 标准品的浓度

a_1 : 标曲的斜率

b_1 : 标曲的截距

ΔF_2 : 血清(浆)样本的绝对荧光值(测定孔荧光值-空白荧光值)

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

ΔF_3 : 组织或细胞样本的绝对荧光值(测定孔荧光值-空白荧光值)

C_{pr} : 样本的蛋白浓度 mgprot/mL

样本胆固醇酯含量计算

$$\text{胆固醇酯含量} = \text{总胆固醇含量} - \text{游离胆固醇含量}$$

附录1 关键数据

1. 技术参数

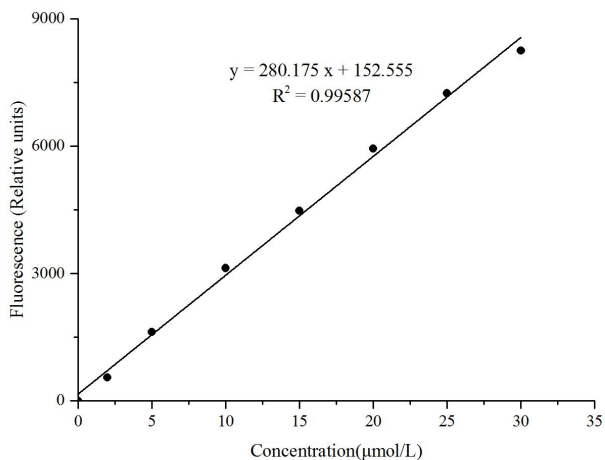
检测范围	0.12-30 $\mu\text{mol/L}$	平均批间差	7.3 %
灵敏度	0.12 $\mu\text{mol/L}$	平均批内差	1.7 %
平均回收率	96 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度标准品加样量50 μL ，按照总胆固醇检测的操作步骤进行实验，读取各点荧光值如下表所示：

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	2	5	10	15	20	25	30
荧光值	210	741	1834	3334	4630	6141	7432	8394
	216	786	1828	3346	4745	6165	7482	8524
平均荧光值	213	764	1831	3340	4688	6153	7457	8459
绝对荧光值	0	550	1618	3127	4475	5940	7244	8246

②绘制标曲(如下图)：



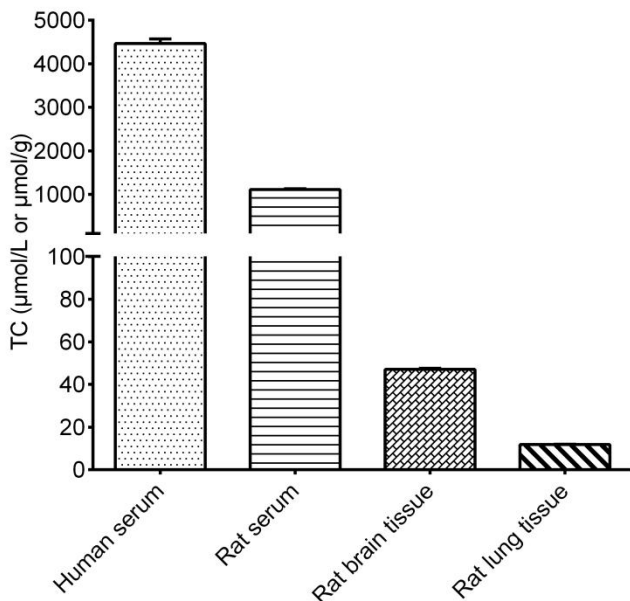
附录2 实例分析

例如检测人血清(数据仅供参考):

总胆固醇测定: 用试剂一将人血清稀释300倍, 取50 μL 稀释后样本按操作表检测, 结果如下: 标准曲线为 $y = 284.28x + 139.79$, 测定孔平均荧光值为4522, 空白孔平均荧光值为148, 计算结果为:

$$\text{总胆固醇含量} = (4522 - 148 - 139.79) \div 284.28 \times 300 = 4468 \mu\text{mol/L} \quad (\mu\text{mol/L})$$

按照说明书操作, 测定人血清(稀释300倍, 加样量50 μL)、大鼠血清(稀释300倍, 加样量50 μL)、大鼠脑组织(10%组织匀浆, 稀释200倍, 加样量50 μL)、大鼠肺组织(10%组织匀浆, 稀释50倍, 加样量50 μL)中总胆固醇含量(如下图):



胆固醇酯测定：用试剂一将人血清稀释300倍，取50 μL 稀释后样本按操作表检测，结果如下：游离胆固醇标准曲线为 $y=274.85x+280.99$ ，测定孔平均荧光值为830，空白孔平均荧光值为125，计算结果为：

$$\text{游离胆固醇含量} = (830 - 125 - 280.99) \div 274.85 \times 300 = 463 \mu\text{mol/L}$$

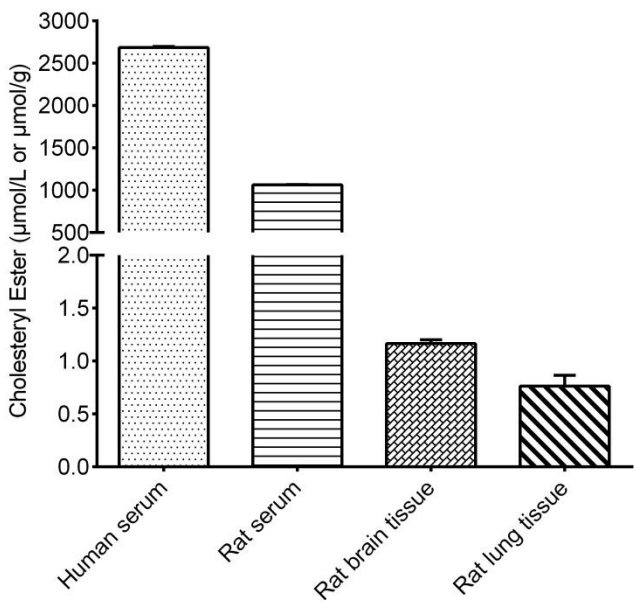
总胆固醇标准曲线为 $y=273.49x+221.46$ ，测定孔平均荧光值为3239，空白孔平均荧光值为149，计算结果为：

$$\text{总胆固醇含量} = (3239 - 149 - 221.46) \div 273.49 \times 300 = 3147 \mu\text{mol/L}$$

胆固醇酯含量 = 总胆固醇含量 - 游离胆固醇含量：

$$\text{胆固醇酯含量} = 3147 - 463 = 2684 \mu\text{mol/L}$$

按照说明书操作，测定人血清(稀释300倍，加样量50 μL)、大鼠血清(稀释100倍，加样量50 μL)、大鼠脑组织(10%组织匀浆，稀释200倍，加样量50 μL)、大鼠肺组织(10%组织匀浆，稀释50倍，加样量50 μL)中胆固醇酯含量(如下图)：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
标准品不成线性	标准品浓度稀释错误	按照标准品稀释表重新稀释标准品
	计算错误	按照计算公式进行计算
	使用过期的试剂	选择在保质期内的试剂
样本测不出值	样本稀释倍数太大	选择合适稀释倍数, 重新检测
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本, 重新检测
读数数值低	用不恰当波长检测	选择正确的检测波长
	试剂二未完全解冻	37℃使试剂二完全解冻

声明

1. 试剂盒仅供研究使用, 如将其用于临床诊断或任何其他用途, 我公司将不对因此产生的问题负责, 亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器, 严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。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。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中, 建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责, 不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责, 使用前请充分考虑样本可能的使用量, 预留充足的样本。

附录4 客户发表文献

1. Peng Hao, Chen Binbin, Wei Wei et al. N-methyladenosine (mA) in 18S rRNA promotes fatty acid metabolism and oncogenic transformation.[J] .Nat Metab, 2022, 4: 1041-1054. IF:19.864
2. Inmaculada López-Almela, Marina Romani-Pérez, Bullich-Vilarrubias C, et al. Bacteroides uniformis combined with fiber amplifies metabolic and immune benefits in obese mice[J]. Gut Microbes, 2021, 13(1), 1865706. IF:10.245
3. Omar N, Frank J, Kruger J, et al. Effects of High Intakes of Fructose and Galactose, with or Without Added Fructooligosaccharides, on Metabolic Factors, Inflammation, and Gut Integrity in a Rat Model[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2021:2001133. IF:5.914
4. Zhu T, Wang Z, Zou T, et al. SOAT1 Promotes Gastric Cancer Lymph Node Metastasis Through Lipid Synthesis. Front Pharmacol. 2021; 12:769647. IF:5.81
5. Zeng X Peng, Wang L J, Guo L H, et al. Dasatinib ameliorates chronic pancreatitis induced by caerulein via anti- fibrotic and anti-inflammatory mechanism[J]. Pharmacological Research, 2019, 147, 104357. IF:5.574
6. Liu K , Zhao X , Qi X , et al. Design, synthesis, and biological evaluation of a novel dual peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta agonist for the treatment of diabetic kidney disease through anti-inflammatory mechanisms[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2021, 218, 113388. IF:5.572
7. Jung D S, Son Y J, Shin J M, et al. Gymnaster Koraiensis Extract Alleviated Metabolic Syndrome Symptoms and Stimulated UCP1-Independent Energy Consumption via AMPK Activation in White Adipose Tissue[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2020. IF:5.309
8. Wang L J, He L, Hao L, et al. Isoliquiritigenin ameliorates caerulein-induced chronic pancreatitis by inhibiting the activation of PSCs and pancreatic infiltration of macrophages[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2020. IF:4.486
9. Ar?can E Y, Kayal? D G, Karaca B U, et al. Reproductive effects of subchronic exposure to acetamiprid in male rats[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 1-10. IF:3.998
10. Luo Y, Qiao X, Ma Y, et al. Disordered metabolism in mice lacking irisin[J]. Scientific Reports, 2020, 10(2). IF:3.998
11. Wang C , Hu N H , Yu L Y , et al. 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside

- attenuates hepatic steatosis via IKK β /NF- κ B and Keap1-Nrf2 pathways in larval zebrafish[J]. *BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY*, 2020, 127: 110138. IF:3.743
12. Yu H, Zhang L, Chen P, et al. Dietary bile acids enhance growth, and alleviate hepatic fibrosis induced by a high starch diet via AKT/FOXO1 and cAMP/AMPK/SREBP1 pathway in *Micropterus salmoides*[J]. *Frontiers in Physiology*, 2019, 10. IF:3.367
 13. Gomaa A A, Farghaly H S M, Dalia A, et al. Inhibition of adiposity and related metabolic disturbances by polyphenol-rich extract of *Boswellia serrata* gum through alteration of adipo/cytokine profiles[J]. *Inflammopharmacology*, 2018: 1-11. IF:3.304
 14. ul Haq M E, Akash M S H, Rehman K, et al. Chronic exposure of bisphenol A impairs carbohydrate and lipid metabolism by altering corresponding enzymatic and metabolic pathways[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2020: 103387. IF:3.292
 15. Messiha B A S, Ali M R A, Khattab M M, et al. Perindopril ameliorates experimental Alzheimer's disease progression: role of amyloid β degradation, central estrogen receptor and hyperlipidemic-lipid raft signaling[J]. *Inflammopharmacology*, 2020. IF:3.283
 16. Kilany O E, Abdelrazek H M A, Aldayel T S, et al. Anti-obesity potential of *Moringa olifera* seed extract and lycopene on high fat diet induced obesity in male Sprague Dawley rats[J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2020, 27(10): 2733-2746. IF:2.802
 17. Akinnuga A M, Siboto A, Khumalo B, et al. Bredemolic Acid Improves Cardiovascular Function and Attenuates Endothelial Dysfunction in Diet-Induced Prediabetes: Effects on Selected Markers[J]. *Cardiovascular Therapeutics*, 2020, 2020. IF:2.538
 18. Badmus O O, Sabinari I W, Olatunji L A. Dexamethasone increases renal free fatty acids and xanthine oxidase activity in female rats: could there be any gestational impact?[J]. *Drug and Chemical Toxicology*, 2020: 1-12. IF:2.405
 19. Gao G, Xie Z S, Li E W, et al. Dehydroabietic acid improves nonalcoholic fatty liver disease through activating the Keap1/Nrf2-ARE signaling pathway to reduce ferroptosis[J]. *Journal of Natural Medicines*, 2021:1-13. IF:2.343
 20. Wang F, Chen H, Chen Y, et al. Diet-induced obesity is associated with altered expression of sperm motility-related genes and testicular post-translational modifications in a mouse model[J]. *Theriogenology*, 2020. IF:2.094
 21. Akinnuga A M, Siboto A, Khumalo B, et al. Bredemolic Acid Ameliorates Selected Liver Function Biomarkers in a Diet-Induced Prediabetic Rat Model[J]. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2020, 2020. IF:2.055
 22. Rahman S U, Huang Y, Zhu L, et al. Tea polyphenols attenuate liver inflammation by

- modulating obesity-related genes and down-regulating COX-2 and iNOS expression in high fat-fed dogs[J]. *BMC Veterinary Research*, 2020, 16(1): 1-12. IF:1.835
23. Adeyemi W J, Abdussalam T A, Abdulrahim A, et al. Elevated, sustained, and yet reversible biotoxicity effects of lead on cessation of exposure: Melatonin is a potent therapeutic option[J]. *Toxicology and Industrial Health*, 2020, 36(7): 477-486. IF:1.708
 24. Hassan S, Moustafa A, Kabil S L, et al. Alagebrium Mitigates Metabolic Insults in High Carbohydrate and High Fat Diet Fed Wistar Rats[J]. *Pharmaceutical Sciences*, 2020, 26(1): 13-24. IF:1.24
 25. Dewi L, Lestari L A, Astiningrum A N, et al. The Alleviation Effect of Combination of Tempeh and Red Ginger Flour towards Insulin Sensitivity in High-Fat Diet Rats[J]. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2020, 8(1): 21-25. IF:0.756
 26. USLU H, USLU G A, ?ZEN H, et al. Effects of different doses of *Prunus laurocerasus* L. leaf extract on oxidative stress, hyperglycaemia and hyperlipidaemia induced by type I diabetes[J]. 2018.
 27. Olakanmi Bodun O, Olorundare Olufunke E, Afolabi Olanrewaju O, et al. Assessment of the Effects of Crude Methanolic Extracts (Leaf and Twig) of *Loranthus micranthus* on Streptozotocin Induced Diabetic Rats[J]. *Journal of Diabetes and Islet Biology*, 2020, 10: 2641-8975.
 28. Singh P, Garg R, Goand U K, et al. Combination of Pancreastatin inhibitor PSTi8 with metformin inhibits Fetuin-A in type 2 diabetic mice[J]. *Heliyon*, 2020, 6(10): e05133.
 29. Susilowati R, Setiawan A M. *Cinnamomum burmannii* (Nees & T. Nees) Blume and *Eleutherine palmifolia* (L.) Merr. extract combination ameliorate lipid profile and heart oxidative stress in hyperlipidemic mice[J]. *Veterinary World*, 2020, 13(7): 1404.

