

游离胆固醇（free cholesterol, FC）含量试剂盒说明书

（微板法 96 样）

一、产品简介：

游离胆固醇（FC）不仅参与形成细胞膜，而且是合成胆汁酸，维生素 D 以及甾体激素的原料。其血清浓度可作为脂代谢的指标。

游离胆固醇（FC）在胆固醇氧化酶作用下被氧化生成 4-胆甾烯酮和 H_2O_2 ；接着与 4-氨基氨替吡啶等反应生成红色醌类化合物，其在 510nm 处有特征吸收峰，通过检测 510nm 处吸光值即可得出 FC 含量。

二、试剂盒的组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	粉剂 mg×1 支	4℃保存	使用前甩几下使试剂落入底部，再加 6.5mL 蒸馏水，充分震荡溶解。
试剂二	液体 16mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 12mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	液体 1mL×1 支	4℃保存	

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、可调式移液枪、水浴锅、离心机、研钵、乙醇、蒸馏水。

四、游离胆固醇（FC）含量测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品和实验流程，避免样本和试剂浪费！

1、样本制备：

- ① 组织样本：称取约 0.1g 组织样本加入研钵中，加入 1mL 乙醇，在冰上进行匀浆，12000rpm，4℃或室温离心 10min，取上清液待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液（mL）为 1：5~10 的比例进行提取。

- ② 细菌/细胞样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 乙醇，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（ 10^4 ）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

- ③ 液体样本：澄清的液体样本直接测定，若浑浊则离心后取上清检测。

2、上机检测：

- ① 酶标仪预热 30 min，调节波长到 510 nm。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃）或于水浴锅（25℃）孵育 15-30min。
- ③ 试剂一和二和三可按照 60:140:120 比例配成混合液（一枪加 320μL 该混合液）（该混合液用多少配多少，现配现用）。
- ④ 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	标准管（仅做一次）	空白管（仅做一次）
标准品		80	
样本	80		
试剂一	60	60	60
试剂二	140	140	220
试剂三	120	120	120
混匀，避光孵育 60min，若浑浊，则于室温 8000rpm 离心 5min，取 200μL 澄清液体至 96 孔板中，于 510nm 处读取各管吸光值 A。			

【注】若测定管的 A 值大于 1，则需将样本进行稀释（用提取液稀释）或减少样本加样量 V1（如减至 20μL，则试剂二相应增加），稀释倍数 D 或样本量 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本质量计算

$$\begin{aligned}\text{FC}(\mu\text{g/g 重量}) &= (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times \text{Mr} \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div (\text{W} \times \text{V1} \div \text{V}) \times \text{D} \\ &= 193.3 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{W} \times \text{D}\end{aligned}$$

2、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned}\text{FC}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div (500 \times \text{V1} \div \text{V}) \times \text{D} \\ &= 0.39 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times \text{D}\end{aligned}$$

3、液体中 FC 含量计算：

$$\begin{aligned}\text{FC}(\mu\text{g/mL}) &= (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times \text{Mr} \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{V1} \times \text{D} \\ &= 193.3 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白})\end{aligned}$$

C 标准---0.5μmol/mL；

V1---样本加入体积，0.04mL；

V---提取液体积，1mL；

500---细胞数量，万；

Mr=386.6---胆固醇分子量；

V2---标准品加入体积，0.04mL；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

W---样本取样质量，g。