

## 游离胆固醇（free cholesterol, FC）含量试剂盒说明书

（货号：G0911W500 微板法 500 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×3 瓶   | 4℃保存 | 每瓶用前甩几下使试剂落入底部，再加 11mL 蒸馏水，充分震荡溶解。 |
| 试剂二  | 液体 80mL×1 瓶 | 4℃保存 |                                    |
| 试剂三  | 液体 65mL×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 320 $\mu$ L 该混合液）（该混合液用多少配多少，现配现用）。

④ 在 EP 管中依次加入：

| 试剂名称（ $\mu$ L） | 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 200 $\mu$ L 澄清液体至 96 孔板中，于 510nm 处读取各管吸光值 A。

## 五、结果计算：

### 1、按样本质量计算

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

### 2、按细胞数量计算：

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

### 3、液体中 FC 含量计算：

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

C 标准---0.5 $\mu\text{mol/mL}$ ;

V1---样本加入体积, 0.08mL;

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, 0.08mL;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

W---样本取样质量, g。