

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0413

Size: 100T/96S

游离胆固醇 (FC) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

FC 是构成细胞膜的主要成分,也是合成肾上腺皮质激素、性激素、胆汁酸及维生素 D 等生理活性物质的重要原料。FC 浓度可作为脂代谢的指标。

二、测定原理:

FC 氧化酶催化 FC 生成 Δ^4 -胆甾烯酮和 H_2O_2 , 过氧化物酶催化 H_2O_2 、4-氨基安替比林和酚生成红色醌类化合物, 在 500nm 有吸收峰, 其颜色深浅与 FC 含量成正比。

三、需自备的仪器和用品:

水浴锅、可调式移液枪、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	异丙醇 100mL		自备
工作液	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂×1 支, 10mg 胆固醇	4℃保存	临用前加入 517 μ L 提取液, 振荡溶解, 即为 50 μ mol/mL 的胆固醇标准溶液。

五、FC 的提取：

1. 组织：按照组织质量 (g)：试剂一体积 (mL) 为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一）进行冰浴匀浆。8000g，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量 (10^4 个)：试剂一体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 2 秒，间隔 3 秒，总时间 3min）；然后 8000g，4℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。
3. 血清（浆）样品：直接测定。

六、测定步骤：

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 500nm，蒸馏水调零。
2. 将 50 $\mu\text{mol/L}$ 标准液用提取液稀释为 2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078 $\mu\text{mol/L}$ 的标准溶液备用。
3. 操作表：（在离心管或 96 孔板中依次加入下列试剂）

	测定管	标准管	空白管
样品 (μL)	20	—	—
标准溶液 (μL)	—	20	—
提取液 (μL)	—	—	20
工作液 (μL)	180	180	180

充分混匀，37℃静置 15min，反应完成后测定 500nm 处吸光值 A，分别记为 A 测定管、A 标准管和 A 空白管， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ ，空白管只需测一次。

七、总胆固醇含量计算

● 标准曲线的绘制：

以各个标准溶液的浓度为 x 轴，其对应的 ΔA 标准为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 带入方程得到 x ($\mu\text{mol/mL}$)

● 游离胆固醇含量的计算：

1. 血清（浆）中FC 含量计算：

FC 含量 ($\mu\text{mol/dL}$) = $x \times 100$ 。

2. 组织中 FC 含量计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算

FC 含量 ($\mu\text{mol/mg prot}$) = $x \times V_{\text{提取}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{提取}}) = x \div C_{\text{pr}}$ 。

(2) 按样本鲜重计算

FC 含量 ($\mu\text{mol/g 鲜重}$) = $x \times V_{\text{提取}} \div W = x \div W$

3. 细胞、细菌中 FC 含量计算：

FC 含量 ($\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}$) = $x \times V_{\text{提取}} \div 500 = 0.002x$ 。

100: 1dL=100mL; $V_{\text{提取}}$: 加入样本的提取液体积, 1mL; W : 样本质量, g; 500: 500 万个细胞数量。

八、注意事项

当 ΔA 大于 1.5 时，建议将样本用提取液稀释后再进行测定。