

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-S0691

Size: 50T/48S

游离胆固醇（FC）检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*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、1mL 玻璃比色皿、研钵/匀浆器、无水乙醇和蒸馏水。

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
提取液	无水乙醇 50mL	常温保存	自备
工作液	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂×1 支	4℃保存	10mg 胆固醇，临用前加入 517 μ L 无水乙醇，振荡溶解，即为 50 μ mol/mL 的胆固醇标准溶液，再将其用无水乙醇稀释为 1 μ mol/mL 的标准品，待测。

五、操作步骤：

● FC 的提取：

1. 组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液）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）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液），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。

● 测定操作：

1. 分光光度计预热 30 min，调节波长到 500 nm，蒸馏水调零。
2. 按需取出一定量工作液，并在 37℃水浴中预热 30min，其余的 4℃保存。
3. 在 1.5mL 离心管中加入下列试剂：

	无水乙醇（ μL ）	标准液（ μL ）	待测上清（ μL ）	工作液（ μL ）
空白管	50			950
标准管		50		950
测定管			50	950

混匀后，室温静置 15min 后于 500nm 下测得吸光度，记为 A 空白管、A 标准管、A 测定管。空白管和标准管分别只需做 1-2 个。

六、计算公式：

● 血清（浆）中 FC 含量计算：

$$\text{FC 含量} (\mu\text{mol/dL}) = C \text{ 标准液} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times 100$$
$$= 100 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})$$

C 标准液: $1\ \mu\text{mol/mL}$; 100 mL: 单位换算系数, $1\text{dL}=100\ \text{mL}$ 。

● 组织中 FC 含量计算:

(1) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{FC 含量} (\mu\text{mol/mg prot}) = \text{C 标准液} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \times V$$
$$\text{样总} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样总}) = (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

$$\text{FC 含量} (\mu\text{mol/g 鲜重}) = \text{C 标准液} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \times V$$
$$\text{样总} \div W = (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div W$$

C 标准液: $1\ \mu\text{mol/mL}$; V 样总: 加入提取液的体积, 1mL ; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL ;

W: 样本质量, g。

● 细胞、细菌中 FC 含量计算:

$$\text{FC 含量} (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = \text{C 标准液} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \times V \text{ 样总}$$
$$\div 500 = 0.002 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})$$

C 标准液: $1\ \mu\text{mol/mL}$; 500: 细菌或细胞数量, 500 万; V 样总: 加入提取液的体积, 1mL 。注: 检测下限: $0.25\ \mu\text{mol/mL}$ 。