

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

微量法 100T/96S

**注 意：**正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

### 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。

### 测定原理：

FC 氧化酶催化 FC 生成 $\Delta^4$ -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。

### 自备仪器和用品：

水浴锅、可调式移液枪、酶标仪、96 孔板、异丙醇和蒸馏水。

### 试剂组成和配置：

试剂一：异丙醇 100mL（自备）；

试剂二：液体 20mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃ 保存；

试剂四：液体 40 $\mu$ L×1 瓶，4℃ 保存；

TC 标准品：液体 1mL×1 支，0.5 $\mu$ mol/mL，4℃ 保存。

### 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：先收集 400-500 万细胞或细菌到离心管内，弃上清，加 1mL 试剂一，超声波破碎 1min（强度 20%，超声 2s，停 1s），即 FC 待测液。
3. 血清（浆）样品：直接测定。

### 测定操作：

1. 酶标仪预热 30 min，调节波长到 500 nm。
2. FC 工作液的配制：临用前，吸取约 0.8mL 试剂二分别加入试剂三和试剂四瓶中，充分溶解后再全部转移回试剂二瓶中，充分混匀，FC 工作液置于 37℃ 水浴 10min。用不完的工作液 4℃ 保存一周。
3. 标准管：依次在 96 孔板中加入 20 $\mu$ L FC 标准液和 180 $\mu$ L FC 工作液，混匀，37℃ 静置 3h 后于 500nm 测定 A 标准管。
4. 测定管：依次在 96 孔板中加入 20 $\mu$ L FC 待测液和 180 $\mu$ L FC 工作液，混匀，37℃ 静置 3h 后于 500nm 测定 A 测定管。

5、空白管：依次在 96 孔板中加入 20 $\mu$ L 试剂一和 180 $\mu$ L FC 工作液，混匀，37 $^{\circ}$ C 静置 3h 后于 500nm 测定 A 测定管。

**注意事项：**

- 1、标准管和空白管只要做一管。
- 2、若测定管产生白色浑浊，可以将待测液用异丙醇稀释 2~5 倍后测定，并在最后结果乘以相应倍数。

**计算公式：**

1. 血清（浆）中 FC 含量计算：

$$\text{FC 含量 } (\mu\text{mol/dL}) = \text{C 标准液} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \times 100\text{mL} \\ = 50 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})$$

C 标准液：0.5 $\mu$ mol/mL；100 mL：1dL=100 mL。

2. 组织中 FC 含量计算：

(1)按样本蛋白浓度计算

$$\text{FC 含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) = \text{C 标准液} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{Cpr} \\ = 0.5 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{Cpr}$$

(2)按样本鲜重计算

$$\text{FC 含量 } (\mu\text{mol/g 鲜重}) = \text{C 标准液} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{W} \\ = 0.5 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{W}$$

C 标准液：0.5 $\mu$ mol/mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g/mL

3. 细胞、细菌中 FC 含量计算：

$$\text{FC 含量 } (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = \text{C 标准液} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{细菌或细胞 } (10^4 \text{ cell/L})$$

$$= 0.5 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{细菌或细胞 } (10^4 \text{ cell/L})$$

C 标准液：0.5 $\mu$ mol/mL。

最低检出限为 1nmol/mL。