

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 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。

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 支，4℃ 保存；

试剂四：粉剂×1 支，-20℃ 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），8000g，4℃ 离心 10min，取上清置冰上待测。
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℃ 保存一个月。
3. 测定管：依次在 96 孔板中加入 **20 μ L FC 待测液**和 180 μ L FC 工作液，混匀，37℃ 静置 1h 后于 500nm 测定 A 测定管。
4. 空白管：依次在 96 孔板中加入 **20 μ L 试剂一**和 180 μ L FC 工作液，混匀，37℃ 静置 1h 后于 500nm 测定 A 空白管。 $\Delta A = A$ 测定管 - A 空白管。

计算公式：

标准条件下回归方程为 $y = 0.4133x - 0.0104$ ， $R^2 = 0.9997$ ；其中 x 为胆固醇浓度（ $\mu\text{mol/mL}$ ），y 为吸光值 ΔA 。

1. 血清（浆）中 FC 含量计算：

$$\begin{aligned} \text{FC } (\mu\text{mol/mL}) &= (\Delta A + 0.0104) \div 0.4133 \\ &= 2.42 \times (\Delta A + 0.0104) \end{aligned}$$

2. 组织中 FC 含量计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{FC } (\mu\text{mol/mg prot}) &= (\Delta A + 0.0104) \div 0.4133 \times V1 \div (V1 \times Cpr) \\ &= 2.42 \times (\Delta A + 0.0104) \div Cpr \end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

$$\text{FC } (\mu\text{mol/g 鲜重}) = (\Delta\text{A} + 0.0104) \div 0.4133 \times \text{V1} \div (\text{W} \times \text{V1} \div \text{V2})$$
$$= 2.42 \times (\Delta\text{A} + 0.0104) \div \text{W}$$

3. 细胞、细菌中 FC 含量计算:

$$\text{FC } (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = (\Delta\text{A} + 0.0104) \div 0.4133 \div (500 \times \text{V1} \div \text{V2})$$
$$= 0.0048 \times (\Delta\text{A} + 0.0104) \div \text{W}$$

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.02mL; V2: 加入提取液体积, 1 mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万;

注意事项

1. 若 ΔA 超过 0.8, 请进行适当的稀释后再进行测定, 并在计算公式中乘以稀释倍数。
2. 测定管如产生白色浑浊, 可将待测液用异丙醇稀释 2-5 倍测定。