

游离胆固醇（FC）含量检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC1895

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

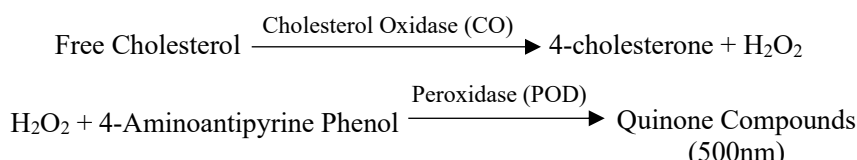
试剂名称	规格	保存条件
提取液	自备试剂	-
工作液	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存

溶液的配制：

- 1、提取液：自备异丙醇，大约需要 110mL，常温保存；试剂盒内提供一个 30mL 棕色空瓶，仅做分装使用，请自行标注试剂名称。
- 2、标准品：10 mg 胆固醇，临用前加入 517 μL 异丙醇，振荡溶解，即为 50 μmol/mL 的胆固醇标准溶液，2-8℃保存 4 周。再将其用异丙醇稀释为 2 μmol/mL 的标准品。
- 3、标准溶液的稀释：取 20 μL 50 μmol/mL 胆固醇标准液，加入 480 μL 异丙醇，充分混匀，配制成 2 μmol/mL 标准液使用，现用现配（实验中每管需要 10 μL，为减小实验误差，故配制大体积）。

产品说明：

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4-胆甾烯酮和H₂O₂，过氧化物酶催化H₂O₂、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。



技术指标：

最低检出限：0.119 μmol/mL

线性范围：0.125-6 μmol/mL

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、异丙醇、蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

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、细胞：按照细胞数量（10⁴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）样本：直接测定。

二、测定步骤

1. 可见分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至500nm，蒸馏水调零。
2. 按需取出一定量的工作液，并在37℃水浴中预热30min。
3. 样本测定：1.5mL离心管/96孔板中加入下列试剂：

试剂名称（μL）	空白管	标准管	测定管
异丙醇	10	-	-
标准液	-	10	-
待测上清	-	-	10
工作液	190	190	190

混匀，室温静置 15min 后于 500nm 下测吸光度，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）

注：若样本为血清，则空白管中的异丙醇需要更换为蒸馏水进行实验。

三、计算公式

1. 血清（浆）中 FC 含量计算：

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

$$= 200 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})$$

2. 组织或细胞、细菌中 FC 含量计算：

- (1) 按样本蛋白浓度计算

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

$$= 2 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div C_{\text{pr}}$$

- (2) 按样本质量计算

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

$$= 2 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div W$$

- (3) 按细胞/细菌数量计算

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

$$= 2 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div N$$

C 标准液：标准液的浓度，2μmol/mL；V 样总：加入提取液的体积，1mL；C_{pr}：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；100：单位换算系数，1dL=100mL；N：细胞数量，以万计。

注意事项：

如果样本吸光值大于 1.2，建议将样本用提取液稀释后进行测定。

实验实例：

1、取 0.1g 小鼠肝脏加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清后按照测定步骤操作，使用 96 孔板测得 A 空白管=0.046、A 标准管=0.354、A 测定管=0.127，按样本质量计算含量得：

FC 含量 ($\mu\text{mol/g}$ 质量) = $2 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div W = 5.320 \mu\text{mol/g}$ 质量。

相关发表文献：

[1] Qin Yuan, Shang Lin, Yuan Fu, et al. Effects of extraction methods on the physicochemical characteristics and biological activities of polysaccharides from okra (*Abelmoschus esculentus*). *International Journal of Biological Macromolecules*. April 2019;127:178-186.

[2] Huan Guo, Shang Lin, MinLua Jia, et al. Characterization, in vitro binding properties, and inhibitory activity on pancreatic lipase of β -glucans from different Qingke (Tibetan hulless barley) cultivars. *International Journal of Biological Macromolecules*. December 2018;

[3] Yao L, Chen S, Li W. Fatostatin inhibits the development of endometrial carcinoma in endometrial carcinoma cells and a xenograft model by targeting lipid metabolism[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2020: 108327.

相关系列产品：

- BC0590/BC0595 游离脂肪酸 (FFA) 含量检测试剂盒
- BC2340/BC2345 脂肪酶 (LPS) 活性检测试剂盒
- BC1080/BC1085 乙醇脱氢酶 (ADH) 活性检测试剂盒
- BC1070/BC1075 丙酮酸脱羧酶 (PDC) 活性检测试剂盒
- BC0620/BC0625 甘油三酯 (TG) 含量检测试剂盒