

游离胆固醇 (free cholesterol, FC) 含量

试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

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、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、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 20 μ L×1 瓶，4℃保存；

FC 标准品：液体 1mL×1 支，0.5 μ 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. 分光光度计/酶标仪预热 30 min, 调节波长到 500 nm, 蒸馏水调零。
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°C 水浴 10min。用不完的工作液 4°C 保存一周。
3. **标准管:** 依次在微量石英比色皿/96 孔板中加入 50 μ L FC 标准品和 150 μ L FC 工作液, 混匀, 静置 24h 后于 500nm 测定 A 标准管。
4. **测定管:** 依次在微量石英比色皿/96 孔板中加入 50 μ L FC 待测液和 150 μ L FC 工作液, 混匀, 静置 24h 后于 500nm 测定 A 测定管。

注意事项:

- 1、标准管只要做一管。
- 2、静置 24h 后部分样本可能出现沉淀, 可经过 10000g, 25°C 离心 5min 后再检测。

计算公式:

1. 血清(浆)中 FC 含量计算:

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

$$= 50 \times A \text{ 测定管} \div A \text{ 标准管}$$

C 标准液: 0.5 μ 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

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

$$= 0.5 \times A \text{ 测定管} \div A \text{ 标准管} \div C_{pr}$$

- (2) 按样本鲜重计算

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

$$= 0.5 \times A \text{ 测定管} \div A \text{ 标准管} \div W$$

C 标准液: 0.5 μ mol/mL; C_{pr}: 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:

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

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

C 标准液: 0.5 μ mol/mL。

最低检出限为 1nmol/mL。