

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。

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 μ L×1瓶，4℃保存；

TC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. 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 μ L FC标准液**和180 μ 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 μ L FC待测液**和180 μ 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 μ L 试剂一**和180 μ L FC工作液，混匀，37℃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：

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

= $50 \times$ （A测定管-A空白管） \div （A标准管-A空白管）

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

2. 组织中FC含量计算：

(1)按样本蛋白浓度计算

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

= $0.5 \times$ （A测定管-A空白管） \div （A标准管-A空白管） \div Cpr

(2)按样本鲜重计算

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

= $0.5 \times$ （A测定管-A空白管） \div （A标准管-A空白管） \div W

C标准液：0.5 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ；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：

FC含量（ $\mu\text{mol}/104\text{ cell}$ ）= C标准液 \times （A测定管-A空白管） \div （A标准管-A空白管） \div 细菌或细胞（104 cell/L）

= $0.5 \times$ （A测定管-A空白管） \div （A标准管-A空白管） \div 细菌或细胞（104 cell/L）

C标准液：0.5 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。

最低检出限为1nmol/mL。