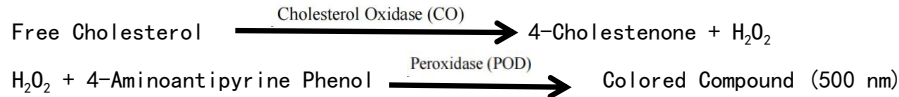


Free Cholesterol Assay Kit, 游离胆固醇(FC)含量检测试剂盒 微量法

产品简介

游离胆固醇(FC)是构成细胞膜的主要成分,也是合成性激素、胆汁酸、维生素D和肾上腺皮质激素等物质的重要原料,FC浓度可作为脂代谢的指标。本试剂盒的检测方法是微量法,既可以用可见分光光度计检测,也可以用酶标仪检测。

作用原理是FC氧化酶可催化FC生成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,其在500 nm有吸收峰,颜色深浅与FC含量成正比。作用方式如下:



测定总胆固醇(TC)请选择 [60723ES](#) 总胆固醇(TC)含量检测试剂盒;测定游离胆固醇(FC)请选择 [60724ES](#) 游离胆固醇(FC)含量检测试剂盒。

产品信息

货号	60724ES60
规格	100 T

组分信息

组分编号	组分名称	规格	储存条件
60724-A	试剂一	30 mL	2~8°C
60724-B	试剂二	160 μ L	2~8°C
60724-C	标准品	10 mg	2~8°C

储存条件

2~8°C保存,有效期6个月。

使用说明

【注意事项】实验之前建议选择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。

1. 需自备的仪器和溶剂:

可见分光光度计/酶标仪、天平、低温台式离心机、水浴锅/恒温培养箱、微量玻璃比色皿/96孔板、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、可调式移液枪、EP管、蒸馏水和异丙醇。

2. 溶液的配制:

- 1) 自备提取液异丙醇:大约需要110 mL,常温保存;试剂盒内提供一个30 mL棕色空瓶,仅做分装使用。
- 2) 标准品溶液的配制:10 mg胆固醇使用前加入517 μ L提取液,振荡溶解后即为50 μ mol/mL的胆固醇标准溶液,2~8°C可保存4周。
- 3) 工作液的配制:根据样本量将试剂一:试剂二按3 mL:20 μ L(约16T)的比例配制工作液,现用现配。

3. 操作步骤:

- 1) 样本处理(可适当调整待测样本量,具体比例可以参考文献)

a. 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 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）进行冰浴匀浆。10000 g，4℃离心 10 min，取上清置冰上待测。

b. 细菌/细胞：按照细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1 mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300 w，超声 2 秒，间隔 3 秒，总时间 3 min）；然后 10000 g，4℃离心 10 min，取上清置于冰上待测。

c. 血清（浆）等液体样本：直接测定，若有沉淀请离心后取上清待测。

2) 测定步骤

a. 可见分光光度计/酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 500 nm，分光光度计蒸馏水调零。

b. 按需取出一定量工作液，临用前 37℃预热 10 min 以上。

c. 将 50 $\mu\text{mol/mL}$ 胆固醇标准品用提取液进行稀释得到 2.5、2、1.25、0.625、0.3125、0.15625 $\mu\text{mol/mL}$ 的标准品备用。

序号	稀释前浓度（ $\mu\text{mol/mL}$ ）	标准品体积（ μL ）	提取液体积（ μL ）	稀释后浓度（ $\mu\text{mol/mL}$ ）
1	50	50	950	2.5
2	2.5	800	200	2
3	2	625	375	1.25
4	1.25	500	500	0.625
5	0.625	500	500	0.3125
6	0.3125	500	500	0.15625

备注：下述实验中每个标准管需 20 μL 标准品（注意不要在此步骤直接检测吸光度）。

d. 在 1.5 mL EP 管/96 孔板按下表步骤加样

试剂名称（ μL ）	测定管	标准管	空白管
样本	20	-	-
标准品	-	20	-
提取液	-	-	20
工作液	180	180	180

充分混匀，37℃静置 30 min，反应完成后测定 500 nm 处吸光值 A，分别记为 A 测定、A 标准和 A 空白， ΔA 测定=A 测定-A 空白， ΔA 标准=A 标准-A 空白。空白管和标准管只需测 1-2 个。注：若样本为血清，则空白管中的提取液（异丙醇）需要更换为蒸馏水进行实验，计算 ΔA 测定=A 测定-A 血清（浆）空白，标准管测定及 ΔA 标准计算不变。

4. 总胆固醇含量计算：

a. 根据标准管的浓度（x， $\mu\text{mol/mL}$ ）和吸光度 ΔA 标准（y， ΔA 标准），建立标准曲线。根据标准曲线，将 ΔA 测定（y， ΔA 测定）带入公式计算样本浓度（x， $\mu\text{mol/mL}$ ）。

b. 游离胆固醇的计算

(1) 按血清（浆）等液体体积计算：FC 含量（ $\mu\text{mol/dL}$ ）= $x \times 100 \times F$

(2) 按样本蛋白浓度计算：FC 含量（ $\mu\text{mol/mg prot}$ ）= $x \times V$ 提取 \div ($Cpr \times V$ 提取) $\times F = x \div Cpr \times F$

(3) 按样本质量计算：FC 含量（ $\mu\text{mol/g 质量}$ ）= $x \times V$ 提取 $\div W \times F = x \div W \times F$

(4) 按细胞/细菌数量计算：FC 含量（ $\mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}$ ）= $x \times V$ 提取 $\div N \times F = x \div N \times F$

100：单位换算系数，1 dL=100 mL；V 提取：加入样本的提取液体积，1 mL；W：样本质量，g；N：细胞/细菌总数，以 10^6 计；Cpr：蛋白浓度，mg/mL；F：样本稀释倍数。

5. 实验实例：

(1) 取 0.1054 g 大鼠肾脏加入 1 mL 提取液进行冰浴匀浆, 按照测定步骤操作, 使用 96 孔板测得 ΔA 测定=A 测定-A 空白 =0.385-0.067=0.318, 根据标准曲线 $y=0.3971x+0.0051$, $R^2=0.9981$, 计算 $x=0.788$, 按样本质量计算含量得: FC 含量 ($\mu\text{mol/g}$ 质量) = $x \div W \times F = 7.476 \mu\text{mol/g}$ 质量。

(2) 取 5×10^6 个 BNL 细胞加入 1 mL 提取液进行超声破碎, 按照测定步骤操作, 使用 96 孔板测得 ΔA 测定=A 测定-A 空白 =0.112-0.067=0.045, 根据标准曲线 $y=0.3971x+0.0051$, $R^2=0.9981$, 计算 $x=0.100$, 按细胞数量计算含量得: FC 含量 ($\mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}$) = $x \div N \times F = 0.02 \mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}$ 。

(3) 取人血清样本, 直接按照测定步骤操作, 使用 96 孔板测得 ΔA 测定=A 测定-A 空白=0.194-0.067=0.128, 根据标准曲线 $y=0.3971x+0.0051$, $R^2=0.9981$, 计算 $x=0.309$, 按血清 (浆) 等液体体积计算含量得: FC 含量 ($\mu\text{mol}/\text{dL}$) = $x \times 100 \times F = 30.7 \mu\text{mol}/\text{dL}$ 。

注意事项

1. 如果测定吸光值超过线性范围吸光值, 可以增加样本量或者用提取液稀释样本 (血清 (浆) 用蒸馏水稀释) 后再进行测定。注意同步修改计算公式。
2. 提取液中含有使蛋白变形的成分, 故按蛋白浓度计算时需要重新提取蛋白进行测定。
3. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
4. 本产品仅作科研用途!