游离胆固醇（free cholesterol, FC）含量试剂盒说明书

（微板法 96 样）

一、产品简介：

游离胆固醇（FC）不仅参与形成细胞膜，而且是合成胆汁酸，维生素 D 以及甾体激素的原料。其血清浓度可作为脂代谢的指标。

游离胆固醇（FC）在胆固醇氧化酶作用下被氧化生成 4-胆甾烯酮和 H_2O_2；接着与 4-氨基氨替吡啉等反应生成红色醌类化合物，其在 510nm 处有特征吸收峰，通过检测 510nm 处吸光值即可得出 FC 含量。

二、试剂盒的组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	粉剂 mg×1 支	4℃保存	**用前甩几下使试剂落入底部，再加 6.5mL 蒸馏水，充分震荡溶解。**
试剂二	液体 16mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 12mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	液体 1mL×1 支	4℃保存	

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、可调式移液枪、水浴锅、离心机、研钵、**乙醇**、蒸馏水。

四、游离胆固醇（FC）含量测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品和实验流程，避免样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：称取约 0.1g 组织样本加入研钵中，加入 1mL 乙醇，在冰上进行匀浆，12000rpm，4℃或室温离心 10min，取上清液待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液(mL)为 1：5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 乙醇，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10^4）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 液体样本：澄清的液体样本直接测定，若浑浊则离心后取上清检测。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30 min，调节波长到 510 nm。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）或于水浴锅（25℃）孵育 15-30min。

③ 试剂一和二和三可按照 60:140:120 比例配成混合液（一枪加 320μL 该混合液）（**该混合液用多少配多少，现配现用**）。

④ 在 EP 管中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	标准管（仅做一次）	空白管（仅做一次）
标准品		80	
样本	80		
试剂一	60	60	60
试剂二	140	140	220
试剂三	120	120	120
混匀，**避光孵育** 60min，若浑浊，则于室温 8000rpm 离心 5min，取 200μL 澄清液体至 96 孔板中，于 510nm 处读取各管吸光值 A。			

【注】若测定管的 A 值大于 1，则需将样本进行稀释（用提取液稀释）或减少样本加样量 V1（如减至 20μL，则试剂二相应增加），稀释倍数 D 或样本量 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本质量计算

FC(μg/g 重量)=(C 标准×V2)×Mr×(A 测定-A 空白)÷(A 标准-A 空白)÷(W×V1÷V) ×D

=193.3×(A 测定-A 空白)÷(A 标准-A 空白) ÷W×D

2、按细胞数量计算：

FC(μg/10^4 cell)=(C 标准×V2)×(A 测定-A 空白)÷(A 标准-A 空白)÷(500×V1÷V) ×D

=0.39×(A 测定-A 空白)÷(A 标准-A 空白) ×D

3、液体中 FC 含量计算：

FC(μg/mL)=(C 标准×V2)×Mr×(A 测定-A 空白)÷(A 标准-A 空白)÷V1×D

=193.3×(A 测定-A 空白)÷(A 标准-A 空白)

C 标准---0.5μmol/mL；

Mr=386.6---胆固醇分子量；

V1---样本加入体积，0.08mL；

V2---标准品加入体积，0.08mL；

V---提取液体积，1mL；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

500---细胞数量，万；

W---样本取样质量，g。