

# 游离胆固醇（FC）含量检测试剂盒说明书

可见分光光度法

**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：AC10355

规格：50T/48S

**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，有疑问请及时联系本公司工作人员。**

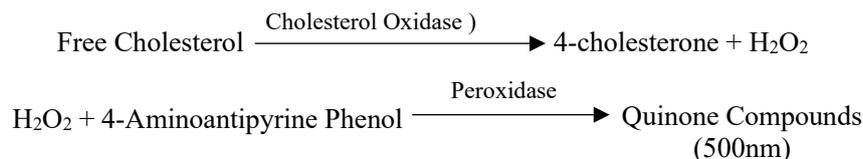
试剂名称	规格	保存条件
提取液	自备试剂	-
试剂一	液体 75 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 450 μL×1 支	2-8°C保存
标准品	粉剂×1 支	2-8°C保存

溶液的配制：

1. 提取液：自备异丙醇，大约需要 60mL，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 提取液，振荡溶解，即为 50 μmol/mL 的胆固醇标准品，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 9mL：60μL（约 10T）的比例配制工作液，现用现配。

## 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H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，过氧化物酶催化H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、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。



**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、天平、低温台式离心机、水浴锅/恒温培养箱、1mL玻璃比色皿、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、可调式移液枪、EP管、冰、蒸馏水、异丙醇（AR，98%）。

## 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。10000g，4°C离心 10min，取上清置冰上待测。

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

3.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。

## 二、测定步骤

1. 可见分光光度计预热30min以上，调节波长至500nm，蒸馏水调零。
2. 工作液临用前37°C预热10min以上。
3. 标准品的稀释：将50 $\mu$ mol/mL胆固醇标准品用提取液进行稀释得到1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078125、0.039、0.0195 $\mu$ mol/mL的标准品备用。
4. 标准品稀释可参考下表：

序号	稀释前浓度（ $\mu$ mol/mL）	标准品体积（ $\mu$ L）	提取液体积（ $\mu$ L）	稀释后浓度（ $\mu$ mol/mL）
1	50	25	975	1.25
2	1.25	500	500	0.625
3	0.625	500	500	0.3125
4	0.3125	500	500	0.15625
5	0.15625	500	500	0.078125
6	0.078125	500	500	0.039
7	0.039	500	500	0.0195

备注：下述实验中每个标准管需100 $\mu$ L标准品（注意不要在此步骤直接检测吸光度）。

5. 在1.5mLEP管按下表步骤加样：

试剂名称（ $\mu$ L）	测定管	标准管	空白管
样本	100	-	-
标准品	-	100	-
提取液	-	-	100
工作液	900	900	900

充分混匀，37°C静置 30min，反应完成后于 1mL 玻璃比色皿，测定 500nm 处吸光值 A，分别记为 A 测定、A 标准和 A 空白， $\Delta A$  测定=A 测定-A 空白， $\Delta A$  标准=A 标准-A 空白。空白管和标准曲线只需测 1-2 次。

注：若样本为血清（浆）等液体样本，则需要增加‘血清（浆）空白管’-即将空白管中的提取液（异丙醇）更换为蒸馏水进行实验，计算  $\Delta A$  测定=A 测定-A 血清（浆）空白，标准管测定及  $\Delta A$  标准计算不变。

## 三、游离胆固醇含量计算

### 1. 标准曲线的绘制：

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

### 2. 游离胆固醇含量的计算：

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

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

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

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

100: 单位换算系数, 1dL=100mL; V提取: 加入样本的提取液体积, 1mL; 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。

#### 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性的成分, 故按蛋白浓度计算时需要重新提取蛋白进行测定。

#### 实验实例:

1. 取 0.1054g 大鼠肾脏加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆, 按照测定步骤操作, 使用 1mL 玻璃比色皿测得  $\Delta A$  测定=A 测定-A 空白=0.592-0.053=0.539, 根据标准曲线  $y=0.7703x-0.0021$ ,  $R^2=0.9989$ , 计算  $x=0.702$ , 按样本质量计算含量得:  
 $FC \text{ 含量}(\mu\text{mol/g 质量}) = x \div W \times F = 6.66 \mu\text{mol/g 质量}$ 。
2. 取  $5 \times 10^6$  个 BNL 细胞加入 1mL 提取液进行超声破碎, 按照测定步骤操作, 用 1mL 玻璃比色皿测得  $\Delta A$  测定=A 测定-A 空白=0.138-0.053=0.085, 根据标准曲线  $y=0.7703x-0.0021$ ,  $R^2=0.9989$ , 计算  $x=0.113$ , 按细胞数量计算含量得:  
 $FC \text{ 含量}(\mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}) = x \div N \times F = 0.0226 \mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}$ 。
3. 取人血清样本, 直接按照测定步骤操作, 使用 1mL 玻璃比色皿测得  $\Delta A$  测定=A 测定-A 空白=0.337-0.041=0.296, 根据标准曲线  $y=0.7703x-0.0021$ , 计算  $x=0.387$ ,  $R^2=0.9989$ , 按血清(浆)等液体体积计算含量得:  
 $FC \text{ 含量}(\mu\text{mol/dL}) = x \times 100 \times F = 38.7 \mu\text{mol/dL}$ 。

#### 相关发表文献:

- [1] Zhang YF, Zhu HL, Xu XF, Zhang J, Ling Q, Zhang S, Chang W, Xiong YW, Xu DX, Wang H. Activation of Atg5-dependent placental lipophagy ameliorates cadmium-induced fetal growth restriction. *Environ Pollut.* 2023 Jul 1;328:121602. doi: 10.1016/j.envpol.2023.121602. Epub 2023 Apr 7. PMID: 37031847.
- [2] Zeng L, Zhou J, Wang X, Zhang Y, Wang M, Su P. Cadmium attenuates testosterone synthesis by promoting ferroptosis and blocking autophagosome-lysosome fusion. *Free Radic Biol Med.* 2021 Nov 20;176:176-188. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.09.028. Epub 2021 Oct 2. PMID: 34610361.
- [3] Zhou J, Zhang Y, Zeng L, Wang X, Mu H, Wang M, Pan H, Su P. Paternal cadmium exposure affects testosterone synthesis by reducing the testicular cholesterol pool in offspring mice. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2022 Sep 1;242:113947. doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.113947. Epub 2022 Aug 8. PMID: 35999762.
- [4] Zhang Y, Zhou J, Zeng L, Xiong Y, Wang X, Xiang W, Su P. Paternal cadmium exposure affects estradiol synthesis by impairing intracellular cholesterol homeostasis and mitochondrial function in offspring female mice. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2023 Sep 15;263:115280. doi: 10.1016/j.ecoenv.2023.115280. Epub 2023 Jul 21. Erratum in: *Ecotoxicol Environ Saf.* 2024 Jan 30;272:115997. PMID: 37481860.
- [5] Liang L, Wang H, Yao J, Wei Q, Lu Y, Wang T, Cao X. NPC1 Deficiency Contributes to Autophagy-Dependent Ferritinophagy in HEI-OC1 Auditory Cells. *Front Mol Biosci.* 2022 Jul 22;9:952608. doi: 10.3389/fmolb.2022.952608. PMID: 35936782; PMCID: PMC9353266.

#### 参考文献:

[1] Lie RF, Schmitz JM, Pierre KJ. et al. Cholesterol oxidase-based determination, by continuous-flow analysis, of total and free cholesterol in serum[J]. Clinical Chemistry, 1976, 22(10): 1627-1630.

[2] Otani T, Ishimaru K, Nakamura S. et al. Determination of total and free cholesterol by using cholesterol oxidase from Streptomyces [J]. Chemical & pharmaceutical bulletin, 1977, 25(6): 1452-1455.

**相关系列产品：**

- AC10172/AC10173 游离脂肪酸（FFA）含量检测试剂盒
- AC10428/AC10429 脂肪酶（LPS）活性检测试剂盒
- AC10238/AC10239 乙醇脱氢酶（ADH）活性检测试剂盒
- AC10236/AC10237 丙酮酸脱羧酶（PDC）活性检测试剂盒
- AC10178/AC10179 甘油三酯（TG）含量检测试剂盒