

游离胆固醇(FC)含量检测试剂盒

Free Cholestenone Assay Kit

微量法

货号: AK229

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液	100ml 异丙醇	室温保存 (自备);
AK229-工作液	20mL×1 瓶	4℃保存;
AK229-标准液	粉剂×1 支	4℃保存; 临用前加入 517 μL 异丙醇, 振荡溶解, 即为 50 μmol/mL 的胆固醇标准溶液, 再将其用异丙醇稀释为 2 μmol/mL 的标准品, 待测。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 游离胆固醇 (Free Cholestenone, 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。

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。

自备用品:

水浴锅、可调式移液枪、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器、异丙醇和蒸馏水。

游离胆固醇提取:

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。8000g, 4℃ 离心 10min, 取上清置冰上待测。
2. 细菌、细胞: 按照细胞数量 (10⁴ 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL 提取液), 冰浴超声波破碎细胞 (功率 300w, 超声 2 秒, 间隔 3 秒, 总时间 3min); 然后 8000g, 4℃, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。
3. 血清 (浆) 样品: 直接测定。

测定步骤:

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. 按需取出一定量工作液, 并在 37℃ 水浴中预热 30min, 其余的 4℃ 保存。
3. 按下表依次加入下列试剂:

试剂名称	空白管 (ul)	测定管 (ul)	标准管 (ul)
异丙醇	10		
上清		10	
AK229-标准液			10
AK229-工作液	190	190	190
混匀后, 室温静置 15min 后于 500nm 下测得吸光度, 记为 A 空白管、A 标准管、A 测定管。			

注意: 空白管、标准管分别只需做 1-2 个。

FC 含量的计算:

1. 血清（浆）中 FC 含量计算

$$\begin{aligned} \text{FC 含量 } (\mu\text{mol/dL}) &= \text{C 标准液} \times (\text{A 测定管}-\text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管}-\text{A 空白管}) \times 100 \\ &= 200 \times (\text{A 测定管}-\text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管}-\text{A 空白管}) \end{aligned}$$

C 标准液: 2 $\mu\text{mol/mL}$; 100: 单位换算系数 1dL=100 mL

2. 组织中 FC 含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{FC 含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) &= \text{C 标准液} \times (\text{A 测定管}-\text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管}-\text{A 空白管}) \times \text{V 样总} \div (\text{Cpr} \times \text{V 样总}) \\ &= 2 \times (\text{A 测定管}-\text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管}-\text{A 空白管}) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算

$$\begin{aligned} \text{FC 含量 } (\mu\text{mol/g 鲜重}) &= \text{C 标准液} \times (\text{A 测定管}-\text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管}-\text{A 空白管}) \times \text{V 样总} \div \text{W} \\ &= 2 \times (\text{A 测定管}-\text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管}-\text{A 空白管}) \div \text{W} \end{aligned}$$

注: C 标准液: 2 $\mu\text{mol/mL}$; V 样总: 加入提取液的体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g

3. 细胞、细菌中 FC 含量计算

$$\begin{aligned} \text{FC 含量 } (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= \text{C 标准液} \times (\text{A 测定管}-\text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管}-\text{A 空白管}) \times \text{V 样总} \div 500 \\ &= 0.004 \times (\text{A 测定管}-\text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管}-\text{A 空白管}) \end{aligned}$$

注: C 标准液: 2 $\mu\text{mol/mL}$; 500: 细菌或细胞数量, 500 万; V 样总: 加入提取液的体积, 1mL