（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

**产品货号：E-BC-K004-M**

**产品规格：48T(44 samples)/96T(92 samples)**

**检测仪器：酶标仪(500-520 nm)**

# Elabscience®游离胆固醇(FC)比色法测试盒

# Free Cholesterol (FC) Colorimetric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

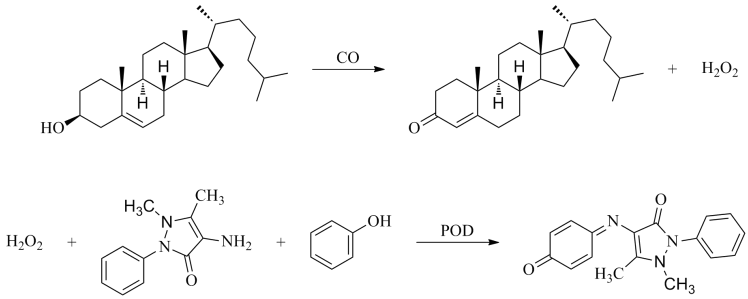
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

## 用途

本试剂盒适用于检测血清、血浆、动物组织样本中的游离胆固醇含量。

## 检测原理

游离胆固醇(Free Cholesterol，FC)在胆固醇氧化酶(Cholesterol oxidase，CO)的氧化作用下生成 4-胆甾烯酮和过氧化氢。过氧化氢在 4-氨基安替吡啉和酚存在时，经过氧化物酶催化，反应生成苯醌亚胺非那腙的红色醌类化合物，其颜色深浅与游离胆固醇含量成正比。其检测原理如下图：




## 提供试剂和物品

| 编号 | 名称 | 规格 1 (Size 1)(48 T) | 规格 2 (Size 2)(96 T) | 保存方式 (Storage) |
|---|---|---|---|---|
| 试剂一 (Reagent 1) | 酶工作液 (Enzyme Working Solution) | 15 mL × 1 瓶 | 30 mL × 1 瓶 | 2-8°C 避光保存 6 个月 |
| 试剂二 (Reagent 2) | 5.17 mM 胆固醇标准液 (5.17 mM Cholesterol Standard) | 0.2 mL × 1 支 | 0.2 mL × 1 支 | 2-8°C 保存 6 个月 |
| | 96 孔酶标板 | 48 孔×1 块 | 96 孔×1 块 | 无要求 |
| | 96 孔覆膜 | 2 张 | | |
| | 样本位置标记表 | 1 张 | | |

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

## 所需自备物品

**仪器：**酶标仪(500-520 nm，最佳检测波长 510 nm)

**试剂：**无水乙醇

## 试剂准备

试剂盒中的试剂平衡至室温。

## 样本准备

**① 样本处理**

样本要求：样本中不能添加还原性物质，如抗坏血酸、谷胱甘肽等。

组织样本：常规匀浆处理(匀浆介质为无水乙醇)。

**② 样本的稀释**

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.07-24 mmol/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

| 样本 | 稀释倍数 | 样本 | 稀释倍数 |
|---|---|---|---|
| 人血清 | 不稀释 | 小鼠血清 | 不稀释 |
| 人血浆 | 不稀释 | 兔血清 | 不稀释 |
| 大鼠血清 | 不稀释 | 10%大鼠肾组织 | 不稀释 |

注：稀释液为生理盐水(0.85%)或 1×PBS(0.01 M，pH 7.4)。

## 实验关键点

① 试剂一取用时应倒出部分，再使用，避免试剂污染。

② 样本和标准品加入板孔中时应触底加入。

③ 测定 OD 值时，酶标板孔中不能有气泡。

## 操作步骤

① 空白孔：取 5 μL 双蒸水，加入酶标板对应孔中。

标准孔：取 5 μL 标准品，加入酶标板对应孔中。

样本孔：取 5 μL 待测样本，加入酶标板对应孔中。

② 向步骤①中的各孔加入 250 μL 试剂一。

③ 37℃孵育 10 min，酶标仪 510 nm 波长，测定 OD 值。

**注：试剂加入酶标板孔中，应触板底加入；慢加样，避免产生气泡。(气泡影响测定结果)**

## 操作表

| | 空白孔 | 标准孔 | 样本孔 |
|---|---|---|---|
| 双蒸水(μL) | 5 | -- | -- |
| 标准品(μL) | -- | 5 | -- |
| 待测样本(μL) | -- | -- | 5 |
| 试剂一(μL) | 250 | 250 | 250 |
| 37℃孵育 10 min，酶标仪 510 nm 波长，测定 OD 值。 | | | |

## 结果计算

**血清(浆)等液体样本中 FC 含量计算公式：**

$$\text{FC 含量 (mmol/L)} = \frac{\Delta A_1}{\Delta A_2} \times c \times f$$

**组织中 FC 含量计算公式：**

$$\text{FC 含量 (mmol/kg wet weight)} = \frac{\Delta A_1}{\Delta A_2} \times c \times f \div \frac{m}{V}$$

**注解：**

$\Delta A_1$：样本 OD 值-空白 OD 值

$\Delta A_2$：标准 OD 值-空白 OD 值

c：标准品浓度 (5.17 mmol/L)

f：样本加入检测体系前稀释的倍数

m：组织样本质量 (g)

V：无水乙醇的体积 (mL)

# 附录1 关键数据

## 1. 技术参数

| | | | |
|---|---|---|---|
| **检测范围** | 0.07-24 mmol/L | **平均批间差** | 5.2 % |
| **灵敏度** | 0.07 mmol/L | **平均批内差** | 1.9 % |
| **平均回收率** | 97 % | | |

## 2. 标准曲线(数据仅供参考)

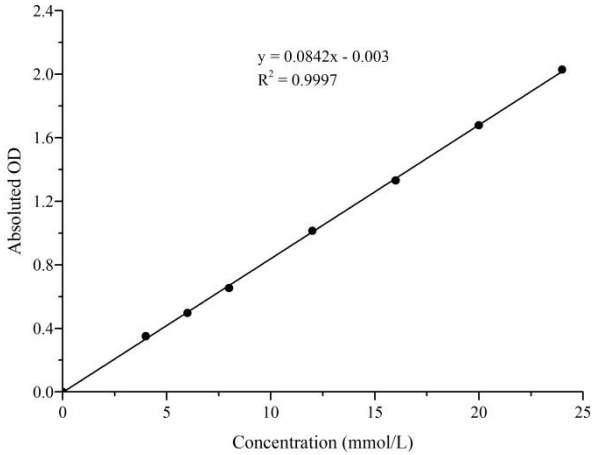
① 标准品稀释：将24 mmol/L胆固醇标准品用双蒸水稀释成以下的浓度：

| **标准品浓度(mmol/L)** | **0** | **4** | **6** | **8** | **12** | **16** | **20** | **24** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 24 mmol/L 胆固醇(μL) | 0 | 100 | 150 | 200 | 300 | 400 | 500 | 600 |
| 双蒸水(μL) | 600 | 500 | 450 | 400 | 300 | 200 | 100 | 0 |

② 不同浓度的标准品加样量5 μL，按照操作步骤进行实验，读取各点OD值如下表所示：

| **标准品浓度 (mmol/L)** | **0** | **4** | **6** | **8** | **12** | **16** | **20** | **24** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **OD 值** | 0.078 | 0.420 | 0.567 | 0.734 | 1.082 | 1.380 | 1.767 | 2.122 |
| | 0.077 | 0.436 | 0.581 | 0.728 | 1.102 | 1.436 | 1.746 | 2.092 |
| **平均 OD 值** | 0.078 | 0.428 | 0.574 | 0.731 | 1.092 | 1.408 | 1.756 | 2.107 |
| **绝对 OD 值** | 0.000 | 0.351 | 0.497 | 0.653 | 1.014 | 1.331 | 1.679 | 2.029 |

②绘制标曲(如下图)：


y = 0.0842x - 0.003
R² = 0.9997
Absoluted OD
Concentration (mmol/L)
0.0
0.4
0.8
1.2
1.6
2.0
2.4
0
5
10
15
20
25

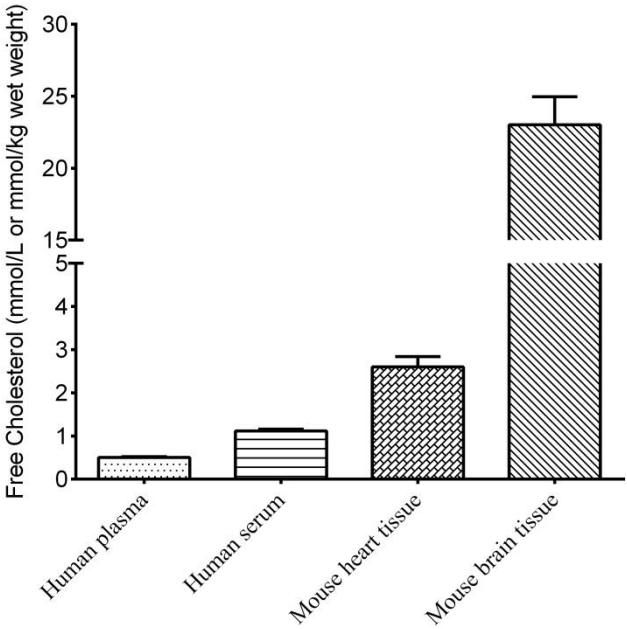
# 附录2 实例分析

**例如检测小鼠脑组织(数据仅供参考)：**

取5 μL的10%小鼠脑组织匀浆液，按操作表检测，结果如下：测定孔平均OD值为0.318，空白平均OD值为0.089，标准孔平均OD值为0.519，计算结果为：

$$\text{FC 含量 (mmol/kg wet weight)} = (0.318 - 0.089) \div (0.519 - 0.089) \times 5.17 \times 0.9 \div 0.1 = 24.78 \text{ mmol/kg wet weight}$$

按照说明书，测定人血浆(加样量5 μL)、人血清(加样量5 μL)、小鼠心组织(10%组织匀浆，加样量5 μL)、小鼠脑组织(10%组织匀浆，加样量5 μL)中的游离胆固醇含量(如下图)：



## 附录3 问题答疑

| 问题 | 可能原因 | 建议解决方案 |
| --- | --- | --- |
| 绝对 OD 值低 | 样本值低 | 减小稀释倍数 |
| 样本测不出值 | 样本稀释倍数太大 | 选择合适稀释倍数，重新检测 |
| | 样本保存时间过长或者保存不当 | 取新鲜样本，重新检测 |
| 样本测量结果 >24.0mmol/L | 样本浓度太高 | 选择合适稀释倍数，重新检测 |

**声明**

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

# 附录4 客户发表文献

1. Zhicheng P , Jialan L , Liding Z ,et al.CircARCN1 aggravates atherosclerosis by regulating HuR-mediated USP31 mRNA in macrophages[J].Cardiovascular Research, 2024(13):13.DOI:10.1093/cvr/cvae148.

2. Baldea I , Moldovan R , Nagy A L ,et al.Ketoconazole-Fumaric Acid Pharmaceutical Cocrystal: From Formulation Design for Bioavailability Improvement to Biocompatibility Testing and Antifungal Efficacy Evaluation[J].International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(24).DOI:10.3390/ijms252413346.