CheKine™ 游离胆固醇（FC）检测试剂盒（微量法）

货号: KTB2210　　规格: 48 T/48 S　96 T/96 S　　批号：见产品标签

≠	**检测范围：**0.09-9 μmoL/mL		**灵敏度：**0.09 μmoL/mL
	适用样本：血清（浆）、动物组织、细胞或细菌		
	保质期：-20℃，避光保存 6 个月		

01 背景与原理

游离胆固醇（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。组织 FC 浓度可作为脂代谢的指标。

本试剂盒检测原理是胆固醇氧化酶催化 FC 生成Δ4-胆甾烯酮和 H_2O_2，过氧化物酶催化 H_2O_2、4-氨基安替比林和苯酚生成红色醌类化合物，在 500 nm 处有吸收峰，其颜色深浅与 FC 含量成正比。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Reagent Ⅰ	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20℃，避光保存
Reagent Ⅱ	5 mL	10 mL	4℃
Reagent Ⅲ	10 mL	20 mL	4℃，避光保存
Standard	1 mL	1 mL	-20℃，避光保存

***请在实验前检查各组分的量。**

***各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。**

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 500 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	PBS、无水乙醇	清洗样本/提取样本、检测用
其他	恒温箱、制冰机、低温离心机、1.5 mL 离心管、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- **正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。**
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。提取液中含有使蛋白变性的成分，样本需另行用去离子水按照步骤提取。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，**请在实验全程做好生物安全防护**，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

05-1-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Working Reagent Ⅰ	临用前配制；48 T 加入 4 mL Reagent Ⅱ，96 T 加入 8 mL Reagent Ⅱ，充分溶解待用	未用完的试剂4℃保存1周或-20℃避光分装保存 1 个月，避免反复冻融
Reagent Ⅱ	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Reagent Ⅲ	即用型；使用前平衡到室温	4℃避光保存
Standard	即用型；使用前平衡到室温	-20℃避光保存

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本。样本尽量新鲜提取，如果不能当天提取，则把收集好的细菌、细胞和血清或者分装的组织块保存在-80℃，一个月内使用。当准备好进行该项实验时，将样本从-80℃拿出后，冰上解冻。但是请注意，这可能会影响样本的稳定性，实验结果可能会低于预期。检测时间不宜超过 1 h。

- **动物组织：**称取约 0.1 g 组织，加入 1 mL 无水乙醇，冰浴匀浆，8000 g，4℃离心 10 min，取上清液，置冰上待测。
- **细胞或细菌：**收集 5×10^6 个细胞或细菌，用冷 PBS 清洗细胞或细菌，800 g 离心 2 min，弃上清液。加入 1 mL 无水乙醇，冰浴超声波破碎细胞或细菌 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30

次），8000 g，4℃离心 10 min，取上清液，置冰上待测。

- **血清（浆）：**直接检测。

05-3 实验步骤

1. **酶标仪准备**：预热 30 min 以上，调节波长到 500 nm。
2. **Working Reagent 的配制**：临用前配制；每孔配制 200 μL Working Reagent，根据实验用量将 Working Reagent Ⅰ和 Reagent Ⅲ按照 1: 3 的比例混合均匀，现配现用。
3. **检测体系配制**：在 96 孔板中按照如下方式操作，空白孔和标准孔只需做 1-2 次：

试剂	空白孔（μL）	标准孔（μL）	测定孔（μL）
无水乙醇	5	0	0
Standard	0	5	0
样本	0	0	5
Working Reagent	200	200	200

4. **吸光度检测：**混匀后 37℃孵育 30 min，记录 500 nm 处吸光值。空白孔记为 $A_{空白}$，标准孔记为 $A_{标准}$，测定孔记为 $A_{测定}$。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧**二维码**或访问官网[https://www.abbkine.cn]>进入“**技术中心**”>查找“**在线计算器**”**工具**。

06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算$\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{空白}$，$\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白}$。

2. FC 含量的计算

- 按蛋白浓度计算：

FC 含量(μmol/mg prot)=$C_{Standard}\times\Delta A_{测定}\div\Delta A_{标准}\times V_{样}\div(Cpr\times V_{样})$**=5×$\Delta A_{测定}\div\Delta A_{标准}\div$Cpr**

- 按样本鲜重计算：

FC 含量(μmol/g)=$C_{Standard}\times\Delta A_{测定}\div\Delta A_{标准}\times V_{样}\div(W\times V_{样}\div V_{样总})\times n$**=5×$\Delta A_{测定}\div\Delta A_{标准}\div$W×n**

- 按细胞或细菌数量计算：

FC 含量(μmol/10^4)=$C_{Standard}\times\Delta A_{测定}\div\Delta A_{标准}\times V_{样}\div(N\times V_{样}\div V_{样总})\times n$**=5×$\Delta A_{测定}\div\Delta A_{标准}\div$N×n**

- 按液体体积计算：

FC 含量(μmol/mL)=$C_{Standard}\times\Delta A_{测定}\div\Delta A_{标准}\times n$**=5×$\Delta A_{测定}\div\Delta A_{标准}\times$n**

$C_{Standard}$：5 μmol/mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；$V_{样}$：加入反应体系中样本体积，0.005 mL；W：样本鲜重，g；$V_{样总}$：样品制备加入无水乙醇的体积，1 mL；N：细胞或细菌数量，以 10^4 为单位（例如细胞数量为 5×10^6，N=500）；n：样本稀释倍数。

07 结果展示

示例-1：取 5 μL 小鼠血清，按上述步骤操作，用 96 孔板测得$\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{空白}=0.178-0.048=0.13$，$\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白}=0.582-0.048=0.534$，按液体体积计算含量得：FC 含量(μmol/mL)=**5×$\Delta A_{测定}\div\Delta A_{标准}\times$n**=1.22 μmol/mL。

08 FAQ

- **检测得到的样本$\Delta A_{测定}$过高或者过低怎么办?**

如果样本$\Delta A_{测定}$>1.0，样本需用无水乙醇适当进行稀释后，再进行实验，结果乘以稀释倍数，或减少提取用样本量。如果样本的$\Delta A_{测定}$<0.01，可适当提高样本量。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB2200	CheKine™ 甘油三酯（TG）检测试剂盒（微量法）
KTB2220	CheKine™ 总胆固醇（TC）检测试剂盒（微量法）

CheKine™ 游离胆固醇（FC）检测流程示意图

（Abbkine 货号 ： KTB2210）

