

游离胆固醇(FC)检测试剂盒(COD-PAP 单试剂比色法)说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

产品简介：

胆固醇(Cholesterol)又称胆甾醇，是一种环戊烷多氢菲的衍生物，广泛存在于动物体内，其中脑、神经组织最丰富，在肾、脾、皮肤、肝和胆汁中含量也较高，用酶学方法测定总胆固醇(TotalCholesterol, TC)是生化检测中的常用方法，其特点是：1、灵敏度、准确度、精密度均高；2、使用温和的反应条件；3、操作简便；4、适用于自动分析仪。

游离胆固醇(FC)检测试剂盒(COD-PAP 单试剂比色法)又称胆固醇氧化酶法或胆固醇氧化酶-过氧化物酶偶联法等，血液中的胆固醇约 1/3 为游离胆固醇，2/3 为与脂肪酸结合的胆固醇酯，后者被胆固醇酯酶(CEH)水解为游离胆固醇，游离胆固醇被胆固醇氧化酶(COD)氧化成胆甾烯酮，并产生过氧化氢，再经过氧化物酶(POD)催化，使 4-氨基安替比林与酚(三者合称 PAP)反应，生成红色醌亚胺色素(Trinder 反应)，当 CEH 不存在时，胆固醇酯不能被水解，因而只能检测到游离胆固醇的含量，分光光度计在 500~520nm 处进行比色测定，用于定量测定人或动物的血清、血浆、脑脊液、细胞、组织等样本中的游离胆固醇含量。该试剂盒仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成：

名称		规格	保存条件
游离胆固醇(FC)检测试剂盒(COD-PAP 单试剂比色法)		100T	4℃ 避光
试剂(A): COD-PAP 工作液	Good'sBuffer	2×50ml	-20℃ 避光
	胆固醇氧化酶		
	过氧化物酶		
	4-氨基安替比林		
	稳定剂		
试剂(B):FC 标准(5mmol/L)		1ml	-20℃ 避光
试剂(C):ddH2O		1ml	RT
使用说明书		1 份	
有效期		6 个月	

自备材料：

- 1、生理盐水或 PBS

- 2、离心管、小试管或 96 孔板
- 3、水浴锅或恒温箱
- 4、分光光度计或酶标仪
- 5、全自动或半自动生化分析仪

操作步骤(仅供参考):

1、样本处理:

①血清、血浆、脑脊液样本: 从待测样本中分离出的血清或血浆不应有溶血, 直接检测, 如超过线性范围, 用生理盐水稀释后检测。

②细胞样本:

a.取适量的细胞(一般推荐>10⁶ 以上), 1000g 离心 10min, 弃上清, 留取沉淀。

b.用 PBS 或生理盐水清洗 1~2 次, 1000g 离心 10min, 弃上清, 留取沉淀。

c.加入 200~300 μl 的 PBS 或生理盐水匀浆, 冰浴条件下超声破碎细胞, 功率 300W, 每次 3~5s, 间隔 30s, 重复 3~5 次, 亦可手动匀浆, 制备好的匀浆液不可离心; 亦可用 1~2%TritonX-100 冰浴 30~60min, 制备好的裂解液不可离心。

③组织样本: 准确称取适量组织样本, 按质量(g): 生理盐水或 PBS(ml)=1: 9 的比例, 加入生理盐水或 PBS, 冰浴条件下手动或机械匀浆, 2500~3000g 离心 10min, 取上清。

2、TC 测定

酶标仪、全自动生化分析仪 FC 测定			
加入物(μl)	空白孔	标准孔	待测孔
ddH ₂ O	3	—	—
FC 标准(5mmol/L)	—	—	3
待测样本	0.3	0.3	0.3
COD-PAP 工作液	300	300	300
分光光度计(1ml 比色杯)、半自动生化分析仪 FC 测定			

加入物(ml)	空白管	标准管	待测管
ddH ₂ O	0.01	—	—
FC 标准(5mmol/L)	—	0.01	—
待测样本	—	—	0.01
COD-PAP 工作液	1	1	1
普通分光光度计(2ml 比色杯)FC 测定			

加入物(ml)	空白管	标准管	待测管
ddH ₂ O	0.02	—	—
FC 标准(5mmol/L)	—	0.02	—
待测样本	—	—	0.02

COD-PAP 工作液	2	2	2
-------------	---	---	---

①各种仪器按上表依次加入试剂，充分混匀,37℃水浴中孵育 5min。

②立即用相应仪器测定 500~520nm 吸光度，以空白孔(管)调零，读取标准孔(管)、测定孔(管)的吸光度，分别记为 A 标准、A 测定。

机器参数:

主波长/次波长	500/600nm
反应类型	终点法
反应方向	升反应(+)

计算公式:

血清、血浆等液体样本(空白调零):

$$FC(\text{mmol/L}) = A \text{ 测定} / A \text{ 标准} \times 5$$

血清、血浆等液体样本(全自动生化分析仪):

$$FC(\text{mmol/L}) = (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) / (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times 5$$

组织样本(空白调零):

$$FC(\text{mmol/g}) = A \text{ 测定} / A \text{ 标准} \times 5 \times V2 / (m \times 1000)$$

组织样本(全自动生化分析仪):

$$FC(\text{mmol/g}) = (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) / (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times 5 \times V / (m \times 1000)$$

细胞样本(空白调零):

$$FC(\text{mmol/L}) = A \text{ 测定} / A \text{ 标准} \times 5 \times V2 / V1$$

细胞样本(全自动生化分析仪):

$$FC(\text{mmol/L}) = (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) / (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times 5 \times V2 / V1 \text{ 式中: } m = \text{组织样本取样量 (g)}$$

V1=细胞样本取样量 (ml)

V2=样本匀浆液总体积 (ml)

参考区间：【FC 标准(5mmol/L)=442.48mg/dl】

健康成年人理想范围：<1.7mmol/L(<67mg/dl)

性能指标：

外观	无色至淡黄色澄清液体
线性范围	0.1~13mmol/L(3.6~500mg/dl), R2>0.95
灵敏度	检测下限 0.1mmol/L(3.6mg/dl)
变异系数	批内<3%，批间<5%
空白吸光值	<0.1(1cm 光径)
干扰因素	胆红素 <410 μ mol/L；血红蛋白 <7g/L；甘油三脂 <28.5mmol/L 时，对结果无明细影响。

注意事项：

- 1、上述低温试剂避免反复冻融，以免失效或效率下降。
- 2、COD-PAP 工作液如不经常使用，应充分溶解后分装-20℃保存，可 4℃短期保存。
- 3、本法可直接用于检测脑脊液中的 FC 含量，但不能直接检测尿液中的 FC 含量，因为未经处理的尿液中含有还原性物质，影响过氧化物酶反应。
- 4、检测 FC 的血清或血浆宜用 EDTA 或肝素抗凝，如不能及时测定，密闭保存，4℃可稳定 1 周，-20℃可以稳定半年以上。
- 5、本法线性范围可达 13mmol/L，如果样本 FC 浓度过高，结果可能呈假性降低，应用生理盐水稀释后重测，结果乘以稀释倍数。
- 6、该试剂盒既可作终点法检测，又可作速率法检测。
- 7、本法不适于检测总胆固醇的浓度，如需检测总胆固醇(TC)含量，请选择相关产品。

