组织游离胆固醇酶法测定(Tissue free cholesterol) E1016

描述：在实体组织和细胞内，胆固醇酯既是构成细胞质膜的成分，也是细胞内脂滴的主要组分。细胞内胆固醇过度聚集与动脉粥样硬化泡沫细胞形成密切相关。实体组织和细胞的胆固醇测定远比血液胆固醇测定复杂。本试剂盒避免了有毒的有机溶剂抽提、繁杂的氮气吹干和脂质复溶等步骤，采用高效能试剂裂解细胞和提取胆固醇，优化了酶学反应和操作步骤，简单易行，灵敏度高，线性范围 **20~5000 μmol/L**。

原理：本试剂盒采用 WHO、中国《全国临床检验操作规程》推荐的酶学方法，结合经典 GPO Trinder 酶学反应 [1,2]，原理如下：(1) 胆固醇酯酶分解胆固醇酯为游离胆固醇。(2) 胆固醇氧化酶将游离胆固醇氧化，反应过程产生过氧化氢。(3) 在过氧化物酶催化下进行生色反应，在 550nm 有最大吸收峰，光密度值与胆固醇浓度成正比。

参考文献

1. Trinder P. Ann. Clin. Biochem. 1969, 6: 24-27.
Barham D and Trinder P. Analyst. 1972, 97: 142-145

适于测定样品：(1) 动物实体组织 (2) 培养细胞

组成 (105 次微板测定或 30 次 1 ml 比色杯测定)：
(1) 裂解液 100 ml (2)R1 试剂 16 ml (3)R2 试剂 4 ml (4)5 mmol/L 胆固醇标准品 0.5 ml

储存：4 ℃ 保存 6 个月有效

所需设备：酶标仪、生化分析仪或 721、722 型可见光分光光度计。最佳工作波长 550nm，如无此波长建议优先选用 570nm、次选 530、490nm。

操作步骤；

一. 组织细胞裂解:

裂解前，组织或细胞用 PBS 洗涤 2 次去除残存血液或培养基血清，以免影响胆固醇测定。

1) 培养细胞裂解：

消化、离心收集细胞或直接在培养皿内裂解。通常 6 孔板单孔约 $2x10^6$ 个细胞，75cm^2 瓶约 $1x10^7$ 细胞。按比例每 $1x10^6$ 个细胞加 0.1ml 裂解液，震荡混匀，静置 10 分钟。

2） 动物组织裂解：

切记要预先将新鲜组织剪切称重后再进行保存。组织冻存后再进行解冻、剪切、称重可能会产生严重的测量误差。离心管精确称重，加入组织块后再称重，二者相减(即减量称重法)计算组织重量(约 100mg)。强烈建议按比例每 1mg 组织加 10μl 裂解液以减少样品间蛋白和脂质含量变异而产生的误差。（**注意；**裂解液用量在 1ml 或更多可保证有效的裂解与脂质提取）。用电动高速匀浆器或手动玻璃匀浆器破碎组织。（不推荐超声方法，因其不能完全和均匀破碎。应根据预实验调整初始的组织细胞加入量），而后静置 10 分钟。

二. 组织细胞裂解液处理

1. 取适量上清液转移到 1.5ml 离心管，进行步骤 2 的操作。余下的裂解液用 BCA 法蛋白定量试剂盒(货号 P1511)进行蛋白含量测定，或－20℃ 储存。
2. **可选的优化步骤**：70℃ 加热 10 分钟，可能出现絮状沉淀。（此步骤即可在组织量多、胆固醇含量高时采用）。
3. 室温 2000g 离心 5 分钟，取上层清液用于酶学测定。

注意：如果得到上清的上层有较多的白色乳浊样小颗粒，重复步骤2 和3。

三、工作溶液配制: 按 4:1 比例，取 4 ml 试剂 R1 与 1 ml 试剂 R2 混匀，立即使用或 4℃ 保存<1 天，变色弃去。

四、标准品稀释：将 5 mM 胆固醇标准品用无水乙醇稀释为 2500、1250、625、312.5、156、78、39μmol/L。通常稀释 4 个点即可。注意设置零浓度空白对照管。

五、含量测定：

1. 取 190 µl 工作溶液加入微板。
2. 在各工作液中，分别加入 10 µl (5~10µl) 空白对照溶液（无水乙醇或蒸馏水均可）、标准品、待测样品。样品体积不可超过 20µl。如测量值超过线性范围可用裂解液稀释，根据稀释倍数计算浓度。
3. 37℃ 或 25℃ 室温反应 20 分钟然后进行测定。（延长反应时间可能使游离胆固醇值增加，进而使游离胆固醇的数值与总胆固醇值接近。）
4. 先用蒸馏水（或无水乙醇）+工作液的空白管调零，然后测定各管 OD 值。
5. 绘制标准曲线并计算浓度。
   Excel 作图步骤：各标准管 OD 值为 *y* 轴，标准品浓度为 *x* 轴。(1)鼠标左键圈住数据，点击*–做图向导–*，选择*-散点图-*，点击*-完成-*。(2)鼠标右键点图上的某一点，点击 *-添加趋势线-*，点击 *-选项-*，点击 *-显示公式-*和 *-R^2 值-*。
6. 以每 mg 蛋白浓度或细胞数校正胆固醇含量。

总胆固醇测定：请参见组织细胞总胆固醇酶法测定试剂盒货号 E1015、液体样本总胆固酶法测定试剂盒货号 E1005 说明书。

组织胆固醇酯测定：需同时用 E1015 和 E1016 两种试剂盒，分别测定组织总胆固醇和游离胆固醇，二者的差值即为胆固醇酯含量，参见以下说明。

说明：

1. 维生素C>0.18g/L、血红蛋白>2g/L、还原剂二硫苏糖醇、巯基乙醇、高浓度EDTA干扰测试。
2. 不同类型的组织细胞内总胆固醇和游离胆固醇的比例差异很大。延长反应时间可能使游离胆固醇值增加因而使其值与总胆固醇值接近。由差值计算求得的胆固醇酯的值，主要适合血液样品测定，可能不很适合细胞内胆固醇酯测定。其原因主要与细胞内胆固醇酯和游离胆固醇的合成、转运、外流、储存、分解、再酯化等诸多动态生物过程的非线性的高度复杂性有关，还与现有测量方法的局限性有关。胆固醇(酯)的含量以及代谢方式在肝细胞、巨噬细胞、肌肉细胞、成纤维细胞等不同类型的细胞中存在巨大差异。有时以差值计算的胆固醇酯出现背离和偏差，甚至为负值。如果出现这种情况，建议在数据分析时采用胆固醇酯/总胆固醇比值，而非胆固醇酯绝对值；或者尝试用同位素标记方法、薄层层析、HPLC 等方法测定胆固醇酯，或许会有改善。

以下仅仅列举部分使用普利莱游离胆固醇测定试剂盒发表的 SCI 文章，供参考。

1、Zou J, Xu L, Ju Y, et al. Cholesterol depletion induces ANTXR2-dependent activation of MMP-2 via ERK1/2 phosphorylation in neuroglioma U251 cell[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2014, 452(1): 186-190.

2、Li H, Li H, Guo H, et al. Cholesterol suppresses adipocytic differentiation of mouse adipose-derived stromal cells via PPARγ2 signaling[J]. Steroids, 2013, 78(5): 454-461.

3、Tong L T, Zhong K, Liu L, et al. Effects of dietary hull-less barley β-glucan on the cholesterol metabolism of hypercholesterolemic hamsters[J]. Food chemistry, 2015, 169: 344-349.

4、Li H, Guo H, Li H. Cholesterol loading affects osteoblastic differentiation in mouse mesenchymal stem cells[J]. Steroids, 2013, 78(4): 426-433.

5、Wu D M, He Z, Ma L P, et al. Increased DNA methylation of scavenger receptor class B type I contributes to inhibitory effects of prenatal caffeine ingestion on cholesterol uptake and steroidogenesis in fetal adrenals[J]. Toxicology and applied pharmacology, 2015, 285(2): 89-97.