

高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C) 测定试剂盒说明书

(货号: G1221W 微板法 96 样)

一、产品简介:

胆固醇酯酶(ChE)和胆固醇氧化酶(ChOD)经化学修饰后,与葡萄糖硫酸钠、硫化环糊精复合物并用,使对 LDL、VLDL、乳糜微粒的酶反应性降低,只选择性与 HDL-胆固醇发生作用。基于此原理,在第一步反应中使 LDL、VLDL、乳糜微粒与葡萄糖硫酸钠、硫化环糊精复合物结合,在第二步反应中利用化学修饰的 ChE、ChOD,无须分离其他脂蛋白直接测定 HDL-胆固醇。即利用化学修饰的 ChE 催化胆固醇酯水解生成游离胆固醇(FC),FC 在 ChOD 作用下被氧化生成 4-胆甾烯酮和 H_2O_2 ;接着与 4-氨基萘酚吡啶等反应生成红色醌类化合物,其在 546nm 处有特征吸收峰,通过检测 546nm 处吸光值即可得出 HDL-C 含量。

二、试剂盒的组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 18mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液 6mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	液体 0.1mL×1 支	4℃保存	标准品浓度为 1.19mmol/L。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、可调式移液枪、水浴锅、乙醇、离心机、研钵、蒸馏水。

四、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)含量测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

- ① 组织样本:称取约 0.1g 组织样本加入研钵中,加入 1mL 乙醇,进行冰浴匀浆,12000rpm,4℃或室温离心 10min,取上清液待测。

【注】:若增加样本量,可按照组织质量(g):提取液(mL)为 1:5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内,离心后弃上清;取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 乙醇,超声波破碎细菌或细胞(冰浴,功率 200W,超声 3s,间隔 10s,重复 30 次);12000rpm 4℃离心 10min,取上清,置冰上待测。

【注】:若增加样本量,可按照细菌/细胞数量(10^4):提取液(mL)为 500~1000:1 的比例进行提取。

③ 液体样本:澄清的液体样本直接测定,若浑浊则离心后取上清检测。

④ 血清样本:若是常规的澄清的血清样本,可直接按操作表加入试剂后检测;

若血清样本中含的蛋白含量较高,按操作表加入试剂后会产生浑浊现象,可先取 200μL 血清+200μL 乙醇,上下混匀几次,于 8000rpm,4℃或室温离心 5min,取上清液待测。

2、上机检测:

- ① 酶标仪预热 30 min, 调节波长到 546nm。
- ② 所有试剂解冻至室温 (25°C), 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	标准管 (仅做一次)	空白管 (仅做一次)
样本	2.5		
标准品		2.5	
蒸馏水			2.5
试剂一	180	180	180
混匀, 37°C 孵育 5min, 于波长 546nm 处读取各管吸光值 A1。			
试剂二	60	60	60
混匀, 37°C 孵育 10min, 于 546nm 处读取各管吸光值 A2。ΔA=A2-A1。			

【注】1.若测定管的 A2 值大于 1, 则需将样本用乙醇进行稀释, 稀释倍数 D 需代入公式重新计算。

2.若 ΔA_{测定} 低于 ΔA_{空白}, 可增加加样体积 V1 (如测定管的样本量和空白管的蒸馏水增至 5μL 或更多, 则试剂一和二保持不变; 标准品仍为 2.5μL, 额外加 2.5μL 蒸馏水补齐); 或增加样本取样质量 W (如增至 0.2g 或更多), 则改变的 V1 和 W 则代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、按样本质量计算:

$$\text{HDL-C}(\mu\text{mol/g 重量}) = (C_{\text{标准}} \times V_2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (W \times V_1 \div V) \times D$$

$$= 1.19 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W \times D$$

2、按细胞数量计算:

$$\text{HDL-C}(\text{nmol}/10^4\text{cell}) = (C_{\text{标准}} \times V_2) \times 10^3 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (500 \times V_1 \div V) \times D$$

$$= 2.38 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times D$$

3、液体中 HDL-C 含量计算:

$$\text{HDL-C}(\text{mmol/L}) = (C_{\text{标准}} \times V_2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div V_1 \times D$$

$$= 1.19 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times D$$

4、血清中 HDL-C 含量计算:

$$\text{HDL-C}(\text{mmol/L}) = (C_{\text{标准}} \times V_2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div V_1 \times 2 \times D$$

$$= 2.38 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times D$$

C 标准---1.19mmol/L=1.19μmol/mL; V1---样本加入体积, 0.0025mL; V---提取液体积, 1mL;

V2---标准品加入体积, 0.0025mL; D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

2---血清前处理中的稀释倍数; 500---细胞数量, 万; W---样本取样质量, g。