

低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C) 测定试剂盒说明书

(货号: G1222W 微板法 96 样)

一、产品简介:

在胆固醇酯酶(CHER)和胆固醇氧化酶(CHOD)存在的胆固醇测定系统中,加入特异的表面活性剂,选择性地使 LDL-C 溶解,以测定 LDL-胆固醇。其他脂蛋白(HDL、VLDL、乳糜微粒)由于受到表面活性剂和糖化化合物的阻碍而不反应,在反应液中以脂蛋白形式残存。基于这个原理,可以直接测定 LDL-胆固醇。

接着利用酯酶催化胆固醇酯水解生成游离胆固醇(FC),FC在胆固醇氧化酶作用下被氧化生成4-胆甾烯酮和 H_2O_2 ;接着与4-氨基氨替吡啉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LDL-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 3mmol/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、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-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。

2、上机检测:

① 酶标仪预热30min,调节波长到546nm。

② 所有试剂解冻至室温(25℃),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。 | | | |

五、结果计算:

1、按样本质量计算:

$$\begin{aligned} \text{LDL-C}(\mu\text{mol/g 重量}) &= (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\text{W} \times \text{V1} \div \text{V}) \times \text{D} \\ &= 3 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div \text{W} \times \text{D} \end{aligned}$$

2、按细胞数量计算:

$$\begin{aligned} \text{LDL-C}(\text{nmol}/10^4\text{cell}) &= (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times 10^3 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (500 \times \text{V1} \div \text{V}) \times \text{D} \\ &= 6 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times \text{D} \end{aligned}$$

3、液体中 LDL-C 含量计算:

$$\begin{aligned} \text{LDL-C}(\text{mmol/L}) &= (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div \text{V1} \times \text{D} \\ &= 3 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times \text{D} \end{aligned}$$

C 标准---3mmol/L=3μmol/mL;

V1---样本加入体积, 0.0025mL;

V2---标准品加入体积, 0.0025mL;

V---提取液体积, 1mL;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

500---细胞数量, 万;

W---样本取样质量, g。