

低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C) 测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-D012 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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H₂O₂; 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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 18mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	液体 6mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准品	粉剂×1 支	4℃避光保存	1. 临用前 8000g 4℃离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加 0.1ml 蒸馏水, 一周内用完, 配成的浓度见标签。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、天平、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)、乙醇。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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 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。

③ 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（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min（等待仪器过自检程序亦可），设定波长到 546nm。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃），在 96 孔板中依次加入：

试剂组分（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℃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℃孵育 10min，于 546nm 处读取各管吸光值 A2。△A=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△A_{测定}低于△A_{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：

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

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

2、按蛋白含量计算：

$$\text{LDL-C}(\mu\text{mol/mg prot}) = (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\text{Cpr} \times V1 \div V) \times D$$

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

3、液体中 LDL-C 含量计算：

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

4、按细胞数量计算：

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

$$= 2 \times \text{C 标准} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times D$$

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

C 标准---见标签；

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。

Cpr---上清液蛋白浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒

