

高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C) 测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-D011 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

胆固醇酯酶(CHER)和胆固醇氧化酶(CHOD)经化学修饰后,与葡萄糖硫酸钠、硫化环状糊精复合物并用,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、硫化环状糊精复合物结合,在第二步反应中利用化学修饰的CHER、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CHER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HDL-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 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 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。

④ 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。

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 孔板中按下表依次加入：

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。 $\Delta A = A2 - A1$ 。			

【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 $\Delta A_{\text{测定}}$ 低于 $\Delta A_{\text{空白}}$ ，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：

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

2、按蛋白含量计算：

$$\begin{aligned} \text{HDL-C}(\mu\text{mol/mg prot}) &= (C_{\text{标准}} \times V2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (C_{\text{pr}} \times V1 \div V) \times D \\ &= C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}} \times D \end{aligned}$$

3、液体中 HDL-C 含量计算：

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

4、血清中 HDL-C 含量计算：

$$\begin{aligned} \text{HDL-C}(\text{mmol/L}) &= (C_{\text{标准}} \times V2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div V1 \times 2 \times D \\ &= 2 \times C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times D \end{aligned}$$

5、按细胞数量计算：

$$\text{HDL-C(nmol/104cell)} = (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times 103 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \div (500 \times \text{V1} \div \text{V}) \times \text{D} \\ = 2 \times \text{C 标准} \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\Delta A \text{ 标准} - \Delta A \text{ 空白}) \times \text{D}$$

C 标准---见标签； 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。

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