

产品说明书 26 版

基本信息

产品编号:	PS2128
产品名称:	高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)含量检测试剂盒 微量法

产品简介:

高密度脂蛋白是血清脂蛋白中密度最大、颗粒最小的脂蛋白，主要作用为将周围组织的胆固醇运送到肝脏进行降解。众多流行病学研究表明，高密度脂蛋白胆固醇(High-DensityLipoproteinCholesterol, HDL-C)水平与动脉粥样硬化(AS)、冠心病(CHD)呈负相关，对于临床诊断动脉粥样硬化、冠心病、高血压等疾病有重要参考价值。

使用选择性沉淀剂将 HDL-C 特异性分离出来，利用酯酶催化胆固醇酯水解生成游离胆固醇(FC)和游离脂肪酸(FFA)，从而把胆固醇酯转化为 FC；进一步利用胆固醇氧化酶催化 FC 氧化，生成 4-胆甾烯酮和 H₂O₂；最后利用过氧化物酶催化 H₂O₂ 氧化 4-氨基安替比林和苯胺类似物，生成紫色化合物，其在 546nm 有特征吸收峰，其颜色深浅与 HDL-C 含量成正比。

实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者 增加样本量进行检测。

组分:

组分	规格(100T/96S)	储存
提取液一	自备试剂	
提取液二 A	液体 6mL×1 瓶	2-8℃保存
提取液二 B	液体 6mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 2mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 25mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 160 μL×1 支	2-8℃保存
试剂四	液体 25 μL×1 支	2-8℃保存

自备材料: 可见分光光度计/酶标仪、天平、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、可调式移液枪、冰、蒸馏水和异丙醇(>98%, AR)。

操作步骤:

一：溶液配制
1：提取液一：自备异丙醇，大约需要 110mL，常温保存；试剂盒内提供一个 30mL 棕色空瓶，仅做分装使用，请自行标注试剂名称。
2：提取液二：临用前根据样本量按提取液二 A:提取液二 B=50 μL:50 μL(100 μL, 1T)的比例配制提取液二，当天用完。
3：试剂三：使用前将瓶内液体甩离至底部(使用掌上离心机即可)。
4：试剂四：液体置于试剂瓶内 EP 管中，使用前将瓶内液体甩离至底部(使用掌上离心机即可)。
5：标准品：10mg 胆固醇，临用前加入 517 μL 提取液一，振荡溶解，即为 50 μmol/mL 的胆固醇标准品，2-8℃可保存 4 周。
6：工作液的配制：根据样本量按试剂一：试剂二：试剂三：试剂四=0.21mL:2.79mL:20 μL:3 μL(共 3.023mL, 约 16T)的比例配制工作液，现用现配。





二：样本处理(可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献)

1：组织：按照组织质量(g):提取液一体积(mL)为 1:5~10 的比例(建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液一)进行冰浴匀浆。10000g, 4℃离心 10min, 取上清置冰上待测。

2：细菌/细胞：按照细菌/细胞数量(10^6 个):提取液一体积(mL)为 5~10:1 的比例(建议 5×10^6 个细菌/细胞加入 1mL 提取液一)，冰浴超声波破碎细菌/细胞(功率 300W, 超声 2 秒, 间隔 3 秒, 总时间 3min); 然后 10000g, 4℃离心 10min, 取上清置于冰上待测。

3：血清(浆)等液体样本：直接测定。若有沉淀请离心后取上清待测。

三：测定步骤

1：可见分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 546nm, 分光光度计蒸馏水调零。

2：标准品的稀释：将 $50 \mu\text{mol/mL}$ 胆固醇标准品用提取液一进行稀释得到 2.5、2、1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078125 $\mu\text{mol/mL}$ 的标准品备用。

3：标准品稀释可参考表 1：

4：在 1.5mL EP 管按表 2 步骤加样

表 1

序号	稀释前浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)	标准品体积 (μL)	提取液一体积 (μL)	稀释后浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)
1	50	50	950	2.5
2	50	40	960	2
3	2	625	375	1.25
4	1.25	500	500	0.625
5	0.625	500	500	0.3125
6	0.3125	500	500	0.15625
7	0.15625	500	500	0.078125

注意：下述实验中每个标准管需 $100 \mu\text{L}$ 标准品(注意不要在此步骤直接检测吸光度)。

表 2

试剂名称 (μL)	测定管	标准管	空白管
样本	100	-	-
标准品	-	100	二
提取液二	100	100	-
充分混匀，常温静置 10min, 12000rpm 常温离心 10min, 取上清。			
上清	20	20	-
提取液一	-	-	20
工作液	180	180	180
充分混匀，37℃静置 5min, 反应完成后测定 546nm 处吸光值 A, 分别记为 A 测定、A 标准和 A 空白， $\Delta A \text{ 测定} = A \text{ 测定} - A \text{ 空白}$ ， $\Delta A \text{ 标准} = A \text{ 标准} - A \text{ 空白}$ 。空白管和标准曲线只需测 1~2 次。			



注意：若样本为血清(浆)等液体样本，则需要增加‘血清(浆)空白管’-即将空白管中的提取液一(异丙醇)更换为蒸馏水进行实验，计算 ΔA 测定=A 测定-A 血清(浆)空白，标准管测定及 ΔA 标准计算不变。

四：高密度脂蛋白胆固醇含量计算

1：标准曲线的绘制

根据标准管的浓度(x , $\mu\text{mol/mL}$) 和吸光度 ΔA 标准(y , ΔA 标准), 建立标准曲线。根据标准曲线，将 ΔA 测定(y , ΔA 测定)带入公式计算样本浓度(x , $\mu\text{mol/mL}$)。

2：HDL-C 含量的计算

A：按血清(浆)等液体体积计算：

$$\text{HDL-C 含量}(\mu\text{mol/dL})=x \times 100 \times F$$

B：按样本蛋白浓度计算：

$$\text{HDL-C 含量}(\mu\text{mol/mg prot})=x \times V_{\text{提取}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{提取}}) \times F = x \div C_{\text{pr}} \times F$$

C：按样本质量计算：

$$\text{HDL-C 含量}(\mu\text{mol/g 质量})=x \times V_{\text{提取}} \div W \times F = x \div W \times F$$

D：按细胞/细菌数量计算：

$$\text{HDL-C 含量}(\mu\text{mol}/10^6\text{cell})=x \times V_{\text{提取}} \div N \times F = x \div N \times F$$

100:单位换算系数, 1dL=100mL; $V_{\text{提取}}$: 加入提取液一的体积, 1mL; W : 样本质量, g; C_{pr} : 蛋白浓度, mg/mL; N : 细菌或细胞总数, 以 10 计; F : 样本稀释倍数。

注意事项：

1：如果测定吸光值超过线性范围吸光值，可以增加样本量或者用提取液一稀释样本后再进行测定。注意同步修改计算公式。

2：提取液一中含有使蛋白变性的成分，故按蛋白浓度计算时需要重新提取蛋白进行测定。

3：为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

储存：低温运输，2-8℃，6 个月。

实验实例：

1：取 100 μL 大鼠血清样本，按照测定步骤操作，使用 96 孔板测得计算 ΔA 测定=A 测定-A 空白=0.736-0.054=

0.682, 根据标准曲线 $y=0.4526x-0.0077$, $R^2=0.9992$, 计算 $x=1.524$, 按血清(浆)等液体体积计算：

$$\text{HDL-L 含量}(\mu\text{mol/dL})=x \times 100=1.524 \times 100=152.4 \mu\text{mol/dL}。$$

2：取 100 μL 兔血清样本，按照测定步骤操作，使用 96 孔板测得计算 ΔA 测定=A 测定-A 空白=0.985-0.054=0.931, 根据标准曲线 $y=0.4526x-0.0077$, $R^2=0.9992$, 计算 $x=2.074$, 按血清(浆)等液体体积计算：

$$\text{HDL-L 含量}(\mu\text{mol/dL})=x \times 100=2.074 \times 100=207.4 \mu\text{mol/dL}。$$

3：取 0.106g 小鼠肝脏样本，加入 1mL 提取液一，冰浴匀浆，离心后取上清按照测定步骤操作，使用 96 孔板测得计算 ΔA 测定=A 测定-A 空白=0.207-0.054=0.153, 根据标准曲线 $y=0.4526x-0.0077$, $R^2=0.9992$, 计算 $x=0.355$, 按样本质量计算：

$$\text{HDL-L 含量}(\mu\text{mol/g 质量})=x \div W=0.355 \div 0.106=3.349 \mu\text{mol/g 质量}。$$

