

低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C) 测定试剂盒说明书

(分光法 48 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 27mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液 9mL×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:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、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 可见分光光度计预热 30 min,调节波长到 546nm,蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温(25℃),在 1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)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	10		
标准品		10	
蒸馏水			10
试剂一	540	540	540
混匀, 37°C 孵育 5min, 于波长 546nm 处读取各管吸光值 A1。			
试剂二	180	180	180
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 $\Delta A_{\text{测定}}$ 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 20μL 或更多, 则试剂一和二保持不变; 标准品仍为 10μL, 额外加 10μL 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:

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

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, 0.01mL;

V2---标准品加入体积, 0.01mL;

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。