

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)

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 18mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液 6mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂×1 支	4℃保存	临用前加 0.1ml 蒸馏水, 一周内用完, 配成的浓度见标签

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 30 min, 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 A ₁ 。			
试剂二	60	60	60
混匀, 37°C 孵育 10min, 于 546nm 处读取各管吸光值 A ₂ 。ΔA=A ₂ -A ₁ 。			

【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 ΔA_{测定} 低于 ΔA_{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:

$$\begin{aligned} \text{LDL-C}(\mu\text{mol/g 重量}) &= (C_{\text{标准}} \times V_2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (W \times V_1 \div V) \times D \\ &= C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W \times D \end{aligned}$$

2、按细胞数量计算:

$$\begin{aligned} \text{LDL-C}(\text{nmol}/10^4\text{cell}) &= (C_{\text{标准}} \times V_2) \times 10^3 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (500 \times V_1 \div V) \times D \\ &= 2 * C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times D \end{aligned}$$

3、液体中 LDL-C 含量计算:

$$\begin{aligned} \text{LDL-C}(\text{mmol/L}) &= (C_{\text{标准}} \times V_2) \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div V_1 \times D \\ &= C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times D \end{aligned}$$

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。