

高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）含量检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC5325

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	自备试剂	-
提取液二 A	液体 6 mL×1 瓶	2-8°C保存
提取液二 B	液体 6 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 2 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 28 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂三	液体 160 μL×1 支	2-8°C保存
试剂四	液体 25 μL×1 支	2-8°C保存
标准品	粉剂×1 支	2-8°C保存

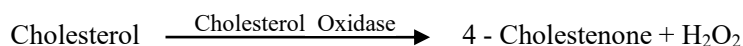
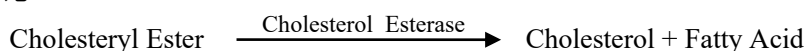
溶液的配制：

1. 提取液：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=50μL：50μL（约 1T）的比例配制成提取液二，当天用完。
3. 试剂四：液体置于试剂瓶内 EP 管中。
4. 标准品：10 mg 胆固醇，临用前加入 517 μL 提取液一，振荡溶解，即为 50 μmol/mL 的胆固醇标准溶液。
5. 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。

产品说明：

高密度脂蛋白（High-Density Lipoprotein Cholesterol, HDL-C）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，HDL-C水平与动脉粥样硬化（AS）、冠心病（GHD）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。



注意：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。

需自备的仪器和用品：

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、异丙醇。

操作步骤：

一、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：按照细胞数量（ 10^4 个）：提取液一体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液一），冰浴超声波破碎细胞（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。

二、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. 标准溶液的稀释：将50 μ mol/mL胆固醇标准溶液用提取液一进行稀释得到2.5、2、1.25、0.625、0.3125、0.15625 μ mol/mL的标准溶液备用。
3. 标准溶液稀释可参考下表：

序号	稀释前浓度（ μ mol/mL）	标准溶液体积（ μ L）	提取液一体积（ μ L）	稀释后浓度（ μ 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

备注：实验中每个标准管需100 μ L标准溶液。

4. 在1.5mLEP管按下表步骤加样：

试剂名称（ μ L）	测定管	标准管	空白管
样本	100	-	-
标准溶液	-	100	-
提取液二	100	100	-
充分混匀，常温静置10min，3000rpm常温离心15min，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 1h，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， ΔA 测定 = A 测定 - A 空白， ΔA 标准 = A 标准 - A 空白。空白管和标准曲线只需测 1-2 次。			

三、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:

(1) 按血清(浆)等液体体积计算:

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

(2) 按样本蛋白浓度计算:

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

(3) 按样本质量计算:

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

(4) 按细胞/细菌数量计算:

$$\text{HDL-C含量} (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = x \times V_{\text{提取}} \div 500 = 0.002x$$

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; 500: 细菌或细胞总数, 500万。

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形的成分, 故按蛋白浓度计算时需要重新提取蛋白进行测定。

实验实例:

- 1、取 0.1mL 人血清样本, 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=0.142-0.060=0.082, 根据标准曲线 $y=0.3888x-0.0502$, 计算 $x=0.340$, 按血清(浆)等液体体积计算:
 $\text{HDL-L 含量} (\mu\text{mol/dL}) = x \times 100 = 0.340 \times 100 = 34.002 \mu\text{mol/dL}$ 。
- 2、取 0.1g 鱼肝样本, 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=0.089-0.060=0.029, 根据标准曲线 $y=0.3888x-0.0502$, 计算 $x=0.204$, 按样本质量计算:
 $\text{HDL-L 含量} (\mu\text{mol/g 质量}) = x \div W = 0.204 \div 0.1 = 2.037 \mu\text{mol/g 质量}$ 。

参考文献:

- [1] Warnick G R, Nauck M, Rifai N I. Evolution of Methods for Measurement of HDL-Cholesterol: From Ultracentrifugation to Homogeneous Assays[J]. Clinical Chemistry, 2001, 47(9):1579-1596.
- [2] Yan S, Lin Q. Methods for Detection of High-Density Lipoprotein Cholesterol and its Standardization[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 1998, 21(1): 19-22.

相关系列产品:

- BC0590/BC0595 游离脂肪酸(FFA)含量检测试剂盒
- BC0750/BC0755 乙醛脱氢酶(ALDH)活性检测试剂盒
- BC1890/BC1895 游离胆固醇(FC)含量检测试剂盒
- BC1980/BC1985 总胆固醇(TC)含量检测试剂盒