高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C) 测定试剂盒说明书

（微板法 96 样）

一、产品简介：

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	液体 0.1mL×1 支	4℃保存	标准品浓度为 1.19mmol/L。

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、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-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。

④ 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。

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℃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。△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$\triangle A_{测定}$低于$\triangle A_{空白}$，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：

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

$$=1.19\times(\triangle A_{测定}-\triangle A_{空白})\div(\triangle A_{标准}-\triangle A_{空白})\div W\times D$$

2、按细胞数量计算：

$$HDL\text{-}C(nmol/10^4cell)=(C_{标准}\times V2)\times10^3\times(\triangle A_{测定}-\triangle A_{空白})\div(\triangle A_{标准}-\triangle A_{空白})\div(500\times V1\div V)\times D$$

$$=2.38\times(\triangle A_{测定}-\triangle A_{空白})\div(\triangle A_{标准}-\triangle A_{空白})\times D$$

3、液体中 HDL-C 含量计算：

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

$$=1.19\times(\triangle A_{测定}-\triangle A_{空白})\div(\triangle A_{标准}-\triangle A_{空白})\times D$$

4、血清中 HDL-C 含量计算：

$$HDL\text{-}C(mmol/L)=(C_{标准}\times V2)\times(\triangle A_{测定}-\triangle A_{空白})\div(\triangle A_{标准}-\triangle A_{空白})\div V1\times2\times D$$

$$=2.38\times(\triangle A_{测定}-\triangle A_{空白})\div(\triangle A_{标准}-\triangle A_{空白})\times D$$

$C_{标准}$---1.19mmol/L=1.19μmol/mL；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。