

## 低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C) 测定试剂盒说明书

(货号: BP10147W 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

### 一、指标介绍:

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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 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:

| 试剂组分 | 试剂规格        | 存放温度   | 注意事项                                                                |
|------|-------------|--------|---------------------------------------------------------------------|
| 试剂一  | 液体 18mL×1 瓶 | 4℃避光保存 |                                                                     |
| 试剂二  | 液体 6mL×1 瓶  | 4℃避光保存 |                                                                     |
| 标准品  | 粉剂×1 支      | 4℃避光保存 | 1. 临用前 8000g 4℃离心 2min 使试剂落入管底;<br>2. 加 0.1ml 蒸馏水, 一周内用完, 配成的浓度见标签。 |

### 三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、天平、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)、乙醇。

### 四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

#### 1、样本提取:

##### 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 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。

##### ③ 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<sup>4</sup>）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

## 2、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min（等待仪器过自检程序亦可），设定波长到 546nm。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃），在 96 孔板中依次加入：

| 试剂组分（μL）                                     | 测定管 | 标准管<br>（仅做一次） | 空白管<br>（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△A<sub>测定</sub>低于△A<sub>空白</sub>，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：

$$\text{LDL-C}(\mu\text{mol/g 重量}) = (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\Delta\text{A 测定} - \Delta\text{A 空白}) \div (\Delta\text{A 标准} - \Delta\text{A 空白}) \div (\text{W} \times \text{V1} \div \text{V}) \times \text{D}$$

$$= \text{C 标准} \times (\Delta\text{A 测定} - \Delta\text{A 空白}) \div (\Delta\text{A 标准} - \Delta\text{A 空白}) \div \text{W} \times \text{D}$$

### 2、按蛋白含量计算：

$$\text{LDL-C}(\mu\text{mol/mg prot}) = (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\Delta\text{A 测定} - \Delta\text{A 空白}) \div (\Delta\text{A 标准} - \Delta\text{A 空白}) \div (\text{Cpr} \times \text{V1} \div \text{V}) \times \text{D}$$

$$= \text{C 标准} \times (\Delta\text{A 测定} - \Delta\text{A 空白}) \div (\Delta\text{A 标准} - \Delta\text{A 空白}) \div \text{Cpr} \times \text{D}$$

### 3、液体中 LDL-C 含量计算：

$$\text{LDL-C}(\text{mmol/L}) = (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\Delta\text{A 测定} - \Delta\text{A 空白}) \div (\Delta\text{A 标准} - \Delta\text{A 空白}) \div \text{V1} \times \text{D}$$

### 4、按细胞数量计算：

$$\text{LDL-C}(\text{nmol}/10^4\text{cell}) = (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times 10^3 \times (\Delta\text{A 测定} - \Delta\text{A 空白}) \div (\Delta\text{A 标准} - \Delta\text{A 空白}) \div (500 \times \text{V1} \div \text{V}) \times \text{D}$$

$$= 2 \times \text{C 标准} \times (\Delta\text{A 测定} - \Delta\text{A 空白}) \div (\Delta\text{A 标准} - \Delta\text{A 空白}) \times \text{D}$$

$$= \text{C 标准} \times (\Delta\text{A 测定} - \Delta\text{A 空白}) \div (\Delta\text{A 标准} - \Delta\text{A 空白}) \times \text{D}$$

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。

Cpr---上清液蛋白浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒