

高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）含量检测试剂盒说明书

可见分光光度法

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：BC5320

规格：50T/48S

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 7.5 mL×1 瓶	2-8℃保存
提取液二 B	液体 7.5 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 5 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 70 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 0.45 mL×1 支	2-8℃保存
试剂四	液体 0.07 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存

溶液的配制：

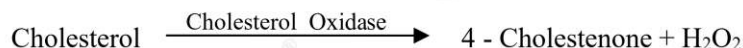
1. 提取液一：自备异丙醇，大约需要 60mL，常温保存；试剂盒内提供一个 30mL 棕色空瓶，仅做分装使用，请自行标注试剂名称。
2. 提取液二：临用前根据样本量按提取液二 A：提取液二 B=100μL：100μL（200μL，1T）的比例配制提取液二，当天用完。
3. 试剂三：使用前将瓶内液体甩离至底部（使用掌上离心机即可）
4. 试剂四：液体置于试剂瓶内 EP 管中，使用前将瓶内液体甩离至底部（使用掌上离心机即可）。
5. 标准品：10 mg 胆固醇，临用前加入 517 μL 提取液一，振荡溶解，即为 50 μmol/mL 的胆固醇标准品，2-8℃可保存 4 周。
6. 工作液的配制：根据样本量按试剂一：试剂二：试剂三：试剂四=0.63mL：8.37mL：60 μL：9 μL（共9.069mL，约10T）的比例配制工作液，现用现配。

产品说明：

高密度脂蛋白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，高密度脂蛋白胆固醇（High-Density Lipoprotein Cholesterol, 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、天平、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、1mL玻璃比色皿、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、可调式移液枪、冰、蒸馏水和异丙醇（>98%，AR）。

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：按照细菌/细胞数量（10⁶ 个）：提取液一体积（mL）为 5~10：1 的比例（建议 5×10⁶ 个细菌/细胞加入 1mL 提取液一），冰浴超声波破碎细菌/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. 可见分光光度计预热30min以上，调节波长至546nm，蒸馏水调零。
2. 标准品的稀释：将50μmol/mL胆固醇标准品用提取液一进行稀释得到 2、1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078125μmol/mL的标准品备用。
3. 标准品稀释可参考下表：

序号	稀释前浓度（μmol/mL）	标准品体积（μL）	提取液一体积（μL）	稀释后浓度（μmol/mL）
1	50	40	960	2
2	2	625	375	1.25
3	1.25	500	500	0.625
4	0.625	500	500	0.3125
5	0.3125	500	500	0.15625
6	0.15625	500	500	0.078125

备注：下述实验中每个标准管需200μL标准品（注意不要在此步骤直接检测吸光度）。

4. 在1.5mL EP管按下表步骤加样：

试剂名称（μL）	测定管	标准管	空白管
样本	200	-	-
标准品	-	200	-
提取液二	200	200	-
充分混匀，常温静置10min，12000rpm 常温离心10min，取上清。			



上清	100	100	-
提取液一	-	-	100
工作液	900	900	900

充分混匀，37°C静置 5min，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。

注：若样本为血清（浆）等液体样本，则需要增加‘血清（浆）空白管’-即将空白管中的提取液一（异丙醇）更换为蒸馏水进行实验，计算 ΔA 测定=A 测定-A 血清（浆）空白，标准管测定及 ΔA 标准计算不变。

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：

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

（2）按样本蛋白浓度计算：

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

（3）按样本质量计算：

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

（4）按细胞/细菌数量计算：

$$\text{HDL-C含量} (\mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}) = x \times V_{\text{提取}} \div N \times F = x \div N \times F$$

100：单位换算系数，1dL=100mL；V_{提取}：加入提取液一的体积，1mL；W：样本质量，g；C_{pr}：蛋白浓度，mg/mL；N：细菌或细胞总数，以10⁶计；F：样本稀释倍数。

注意事项：

- 如果测定吸光值低于或者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（液体样本用蒸馏水稀释）后再进行测定。注意同步修改计算公式。
- 提取液一中含有使蛋白变性的成分，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：

- 取 200 μL 大鼠血清样本，按照测定步骤操作，使用 1mL 玻璃比色皿测得计算 ΔA 测定=A 测定-A 空白=0.962-0.006=0.956，根据标准曲线 $y=0.683x-0.0155$ ， $R^2=0.9999$ ，计算 $x=1.422$ ，按血清（浆）等液体体积计算：
HDL-L 含量 ($\mu\text{mol/dL}$) = $x \times 100 = 1.422 \times 100 = 142.2 \mu\text{mol/dL}$ 。
- 取 200 μL 兔血清样本，按照测定步骤操作，使用 1mL 玻璃比色皿测得计算 ΔA 测定=A 测定-A 空白=1.224-0.006=1.218，根据标准曲线 $y=0.683x-0.0155$ ， $R^2=0.9999$ ，计算 $x=1.806$ ，按血清（浆）等液体体积计算：
HDL-L 含量 ($\mu\text{mol/dL}$) = $x \times 100 = 1.806 \times 100 = 180.6 \mu\text{mol/dL}$ 。
- 取 0.106g 小鼠肝样本，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 1mL 玻璃比色皿测得计算 ΔA 测定=A 测定-A 空白=0.196-0.006=0.190，根据标准曲线 $y=0.683x-0.0155$ ， $R^2=0.9999$ ，计算 $x=0.301$ ，按样本质量计算：





HDL-L 含量 ($\mu\text{mol/g}$ 质量) $=x \div W = 0.301 \div 0.106 = 2.840 \mu\text{mol/g}$ 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
- BC5330/BC5335 低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 含量检测试剂盒

