

高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)测试盒

(货号: BC029 微板法 96T)

一、试剂组成及配制:

试剂组成	规格	保存条件
试剂一	18mL×1瓶	2~8℃ 避光保存
试剂二	6mL×1瓶	
校准品	1支(浓度及配置方法见标签)	
附送96孔平底酶标板一块		室温放置

二、操作过程:

1、样本处理:

- ①、**血清(浆)**: 直接测定, 如超过线性范围用生理盐水稀释后测定。
- ②、**培养液样本**: 吸取培养液, 1000转/分, 离心10分钟, 取上清测定。[注]: 一般建议细胞密度在100万个/mL以上。
- ③、**组织样本**: 准确称取组织重量,按重量(g): 体积(mL)=1: 9的比例, 加入9倍体积的匀浆介质, 冰水浴条件下机械匀浆, 2500转/分, 离心10分钟, 取上清液待测。[注]:如组织样本为非高脂样本, 匀浆介质统一用磷酸盐缓冲液(0.1mol/L pH 7.4)或生理盐水进行提取; 如组织样本为高脂样本或部分为高脂样本, 匀浆介质可统一用无水乙醇进行提取。
- ④、**细胞样本**:
 - A、**细胞收集**:将制备好的细胞悬液取出, 1000转/分, 离心10分钟, 弃上清液, 留细胞沉淀; 用等渗缓冲液(推荐0.1mol/L、pH7~7.4磷酸盐缓冲液)清洗1~2次, 同样1000转/分, 离心10分钟, 弃上清液, 留细胞沉淀;
 - B、**细胞破碎**:加入0.2~0.3mL的匀浆介质(推荐0.1mol/L、pH7~7.4磷酸盐缓冲液或生理盐水)进行匀浆, 冰水浴条件下超声破碎(功率: 300W,3~5秒/次, 间隔30秒, 重复3~5次)或手动匀浆, 制备好的匀浆液不离心待测。也可采用裂解液裂解(推荐TritonX-100, 1~2%, 裂解30~40分钟), 裂解好的液体不离心直接测定。[注]: 建议细胞密度在100万个/mL以上。破碎好的液体可显微镜观察细胞是否破碎完全

2、操作表:

	空白孔	校准孔	样本孔
蒸馏水(μL)	2.5		
校准品(μL)		2.5	
样本(μL)			2.5
试剂一(μL)	180	180	180
轻轻震荡孔板混匀, 37℃震荡孵育5分钟, 波长550nm, 酶标仪测定各孔吸光度值A1			
试剂二(μL)	60	60	60
轻轻震荡孔板混匀, 37℃震荡孵育10分钟, 波长550nm, 酶标仪测定各孔吸光度值A2, 计算ΔA=A2-A1。			

三、计算公式及举例:

1、血清等液体样本计算公式:

$$\text{HDL-C含量 (mmol/L)} = \frac{\Delta A_{\text{样本}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}} \times C_{\text{校准}}$$

$C_{\text{标准}}$:标准品浓度,mmol/L。

例1: 取正常人血浆2.5μL, 按操作表操作, 得空白孔A₁为0.035, 空白孔A₂为0.038, ΔA_{空白}为0.003; 校准孔A₁为0.054, 校准孔A₂为0.143, 则ΔA_{校准}为0.089; 样本孔A₁为0.043, 样本孔A₂为0.113, 则ΔA_{样本}为0.070; 则计算如下:

$$\text{HDL-C含量 (mmol/L)} = \frac{0.070 - 0.003}{0.089 - 0.003} \times 1.64 = 1.28 \text{ mmol/L}$$

例2: 取大鼠血清2.5μL, 按操作表操作, 得空白孔A₁为0.035, 空白孔A₂为0.038, ΔA_{空白}为0.003; 校准孔A₁为0.054, 校准孔A₂为0.143, 则ΔA_{校准}为0.089; 样本孔A₁为0.047, 样本孔A₂为0.088, 则ΔA_{样本}为0.0279; 则计算如下:

$$\text{HDLc含量 (mmol/L)} = \frac{0.0279 - 0.003}{0.089 - 0.003} \times 1.64 = 0.475 \text{ mmol/L}$$

2、组织、细胞样本计算公式:

①、用PBS或生理盐水作匀浆介质提取样本计算方法（此方法需要另外测定匀浆液蛋白浓度，蛋白测定试剂盒本所有售，货号为A045-2或者A045-4）：

$$\text{HDLc含量 (mmol/gprot)} = \frac{\Delta A_{\text{样本}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$

注:Cpr为匀浆液蛋白浓度，gprot/L（prot指蛋白）

②、用无水乙醇作匀浆介质提取样本计算方法（此方法不需要另外测定匀浆液蛋白浓度）：

$$\text{HDLc含量 (mmol/g组织)} = \frac{\Delta A_{\text{样本}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \frac{W}{V_{\text{乙醇}}}$$

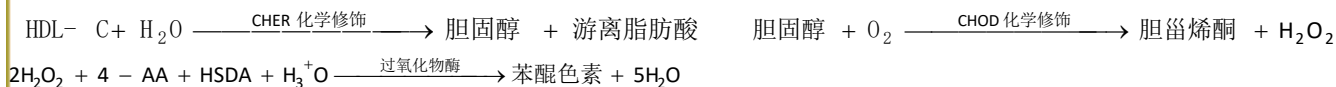
$V_{\text{乙醇}}$ ：样本提取时加入的乙醇的总体积，L。

注：细胞样本测定时可将上式中的 $\frac{W}{V_{\text{乙醇}}}$ 替换为细胞前处理时的细胞密度（ 10^4 个/L）。

例1：取10%小鼠肝匀浆2.5 μ L，按操作表操作，得空白孔A₁为0.035，空白孔A₂为0.038， $\Delta A_{\text{空白}}$ 为0.003；校准孔A₁为0.054，校准孔A₂为0.143，则 $\Delta A_{\text{标准}}$ 为0.089；样本孔A₁为0.091，样本孔A₂为0.109，则 $\Delta A_{\text{样本}}$ 为0.018；同时测得10%小鼠肝匀浆蛋白浓度为18.1133gprot/L，计算如下：

$$\text{HDLc含量 (mmol/gprot)} = \frac{0.018 - 0.003}{0.089 - 0.003} \times 1.64 \div 18.1133$$

四、测定原理:



五、性能指标:

- 1、试剂空白孔吸光度 $\Delta A \leq 0.02$ 。
- 2、线性范围：0.09~2.50mmol/L， $R^2 > 0.990$ 。
- 3、灵敏度：测试1.00mmol/L被测物时，吸光度值 ΔA 大于0.04。
- 4、准确度：相对偏差 $\leq 10\%$ 。
- 5、精密性：CV $\leq 3\%$ ，批间相对极差 $\leq 5\%$ 。
- 6、稳定性：原包装试剂盒在2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C避光保存，有效期为12个月。开启后2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C避光保存，可稳定一个月。

六、注意事项:

- 1、本产品仅用于科研，不得用于临床诊断，切勿服用。
- 2、样品含量如超出检测范围上限时，可用生理盐水稀释样本后进行测定，测定结果乘以稀释倍数。
- 3、试剂防止葡萄糖、胆固醇等试剂的污染。
- 4、试剂与样本量可按照仪器要求，按比例增减。
- 5、样本中HDL-C含量较低时，可以加大样本取样量（如取10 μ L或20 μ L，此时标准品需要稀释相应的倍数后和样本取样量一致，试剂一、二量不变）后测定。
- 6、标准品粉剂为冻干粉，溶解时间较长，配置时可提前半小时配制。

七、参考文献:

- 1、National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Triglyceride, High Density Lipoprotein and Coronary Heart Disease. Washington D.C. Feb 26-28, 1992.
- 2、Sugiuchi, H., Uji, Y., Okabe, H., Irie T., Uekama, K., Kayahara, N; Clin Chem 1995; 1/5:717-723.

八、参考值:

大鼠血浆：0.45 \pm 0.16mmol/L
 小鼠血浆：0.92 \pm 0.11 mmol/L
 鸡血浆：0.36 \pm 0.12（某些种类的能达到2.33 \pm 0.38）mmol/L
 鱼血浆：0.99 \pm 0.22 mmol/L
 小鼠肝脏：12.4 \pm 3.9 μ mol/gprot
 鱼肝脏：39.36 \pm 12.37 μ mol/gprot

注：以上值仅供参考，并无临床学意义

