

低密度脂蛋白胆固醇（LDL-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：AC17852

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，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	自备试剂	-
试剂一 A	液体 60 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一 B	液体 500 μL×1 支	2-8°C保存
试剂一 C	液体 75 μL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 20 mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	粉剂×1 支	2-8°C保存

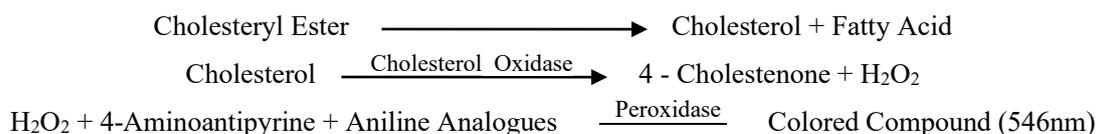
溶液的配制：

- 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、试剂一 C：液体置于试剂瓶内 EP 管中。
- 3、试剂一的配制：根据样本量将试剂一 A：试剂一 B：试剂一 C 按 2.25 mL：20 μL：3 μL（2.273mL，约 3T）的比例进行配制，现用现配，当天用完。
- 4、标准品：10 mg 胆固醇，临用前加入 517 μL 提取液，振荡溶解，即为 50 μmol/mL 的胆固醇标准溶液，2-8°C 可保存 4 周。

产品说明：

低密度脂蛋白是血清脂蛋白中胆固醇含量最高的一种脂蛋白，其颗粒较小，主要作用是将肝脏组织的胆固醇经过血液转运至其他组织，促进组织细胞中胆固醇的积累。众多流行病学研究表明，血清低密度脂蛋白胆固醇（Low-Density Lipoprotein Cholesterol, LDL-C）水平与动脉粥样硬化（AS）、冠心病（GHD）呈正相关，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。

使用选择性表面活性剂，特异性解离出CM、VLDL、HDL中的胆固醇，而不作用于LDL，解离出的胆固醇与胆固醇酯酶(CHER)和胆固醇氧化酶(CHOD)反应产生H₂O₂，在缺乏显色剂的情况下被消耗掉而不显色；未被分解的LDL在另一特异性表面活性剂的作用下解离，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。



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、异丙醇（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）进行冰浴匀浆。10000g，4℃离心 10min，取上清置于冰上待测。
2. 细菌/细胞：按照细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液），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. 可见分光光度计预热30min以上，调节波长至546nm，蒸馏水调零。
2. 根据样本量取试剂一、试剂二37℃预热10min。
3. 标准溶液的稀释：将50 μ mol/mL胆固醇标准溶液用提取液进行稀释得到2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078125、0.0390625 μ mol/mL的标准溶液备用。
4. 标准溶液稀释可参考下表：（实验中每个标准管需20 μ L标准溶液）

序号	稀释前浓度（ μ mol/mL）	标准溶液体积（ μ L）	提取液体积（ μ L）	稀释后浓度（ μ mol/mL）
1	50	50	950	2.5
2	2.5	200	200	1.25
3	1.25	200	200	0.625
4	0.625	200	200	0.3125
5	0.3125	200	200	0.15625
6	0.15625	200	200	0.078125
7	0.078125	200	200	0.0390625

5. 在1mL玻璃比色皿按下表步骤加样：

试剂名称（ μ L）	测定管	标准管	空白管
样本	20	-	-
标准液	-	20	-
提取液	-	-	20
试剂一	750	750	750
充分混匀，37℃静置5min，测定546nm处吸光值A1，分别记为A1测定、A1标准、A1空白。			
试剂二	250	250	250

充分混匀，37℃静置 5min，测定 546nm 处吸光值 A2，分别记为 A2 测定、A2 标准、A2 空白，计算 ΔA 测定 = (A2 测定-A1 测定) - (A2 空白-A1 空白)， ΔA 标准 = (A2 标准-A1 标准) - (A2 空白-A1 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（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、低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. LDL-C含量的计算：

(1) 按血清（浆）等液体体积计算：

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

(2) 按样本蛋白浓度计算：

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

(3) 按样本质量计算：

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

(4) 按细胞/细菌数量计算：

$$\text{LDL-C含量} (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = x \times V_{\text{样本}} \div (N \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}}) = x \div N$$

100：单位换算系数，1dL=100mL；V样本：加入样本上清的体积，0.02mL；V提取：加入提取液的体积，1mL；Cpr：蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；N：细菌或细胞总数，以万计。

注意事项：

1. 如果测定吸光值超出线性范围吸光值，可以增加样本量或者用提取液稀释样本上清（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。
2. 提取液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：

1、取 20 μL 人血清样本，按照测定步骤操作，使用 1mL 玻璃比色皿测得计算 ΔA 测定=（A2 测定-A1 测定）-（A2 空白-A1 空白）=（0.728-0.028）-（0.014-0.013）=0.699，根据标准曲线 $y=0.1723x-0.0178$ ，计算 $x=4.160$ ，按血清（浆）等液体体积计算：

$$\text{LDL-C 含量} (\mu\text{mol/dL}) = x \times 100 = 4.160 \times 100 = 416.019 \mu\text{mol/dL}。$$

2、取 0.11g 小鼠肝脏样本，加入 1mL 提取液，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=（A2 测定-A1 测定）-（A2 空白-A1 空白）=（0.264-0.028）-（0.014-0.013）=0.235，根据标准曲线 $y=0.1723x-0.0178$ ，计算 $x=1.467$ ，按样本质量计算：

$$\text{LDL-C 含量} (\mu\text{mol/g 质量}) = x \div W = 1.467 \div 0.11 = 13.338 \mu\text{mol/g 质量}。$$