

液体样本总胆固醇酶法测定试剂盒 E1005

描述: 血浆总胆固醇包括 2/3 的胆固醇酯和 1/3 的游离胆固醇, 是血脂的重要组成部分, 二者与心脑血管疾病以及多种病理状态密切相关。本试剂盒采用世界卫生组织(WHO)、美国 FDA、中国《全国临床检验操作规程》推荐的总胆固醇和游离胆固醇检测方法, 灵敏度高, 检测范围 **20~5000 $\mu\text{mol/L}$** 。可靠性和重复性俱佳。

原理: 本试剂盒测定方法采用 CHOD-PAP 终点方法结合经典 GPO Trinder 酶学反应^{[1][2]}。其原理为: (1) 胆固醇酯酶分解胆固醇酯为游离胆固醇。(2) 胆固醇氧化酶将游离胆固醇氧化, 产生过氧化氢。(3) 在过氧化物酶催化下生色底物转化为苯醌亚胺, 光密度值与胆固醇浓度成正比。

参考文献

1. Trinder, P. (1969). Annals of Clin. Biochem. 6: 24 – 27
2. Barham D and Trinder P. (1972). Analyst 97: 142 – 145

测定样品范围: 血清、培养基

组成: (1) R1 试剂 40 ml (2) R2 试剂 10 ml (3) 5 mmol/L 胆固醇标准品 0.5 ml

储存条件: 4℃ 保存, 6 个月有效

所需设备: 721、722 型可见光分光光度计、酶标仪、生化分析仪。最佳工作波长 550-555nm, 如仪器无此波长建议优先选用 570 nm, 次选 530、490nm。常规比色杯即可。

操作步骤:

一、工作溶液配制: 按 4:1 比例, 取 4 ml R1 试剂与 1 ml R2 试剂混合均匀, 立即使用或 4℃ 保存 <1 天, 变色弃去。

二、样本处理:

培养基: 取无酚红无血清细胞培养液, 4℃, 10,000g 离心 5 min, 取上清测定。新鲜培养基 4℃ 存放不宜超过 1 小时, 若暂时无法测定可 70℃ 加热 10 min 后冻存, 测定前离心。

血液: 新鲜血液 4℃, 2000 g 离心 5 min 得到血浆, 非抗凝血 4℃ 放置 2 小时得到血清。可 4℃ 存放数天或 -20℃ 半年。如超过线性范围用生理盐水 1:1~1:5 稀释后测定。

三、标准品稀释:

5 mM 胆固醇标准品用无水乙醇倍比稀释为 2500、1250、625、312.5、156、78、39 $\mu\text{mol/L}$ 。通常稀释 4 个点/管即可, 注意设置 0 浓度对照反应管。立即使用。

四、总胆固醇测定:

1. 取 190 μl (190~180 μl) 工作液。
2. 在各工作液中, 分别加入 10 μl (10~20 μl) 空白对照溶液 (无水乙醇或蒸馏水均可)、标准品、待测样品, 反应总体积 200 μl 。
3. 37℃ 反应 20min 也可 25℃ 室温反应 30 min 但灵敏度会略微下降。反应平衡后颜色在 60 min 内稳定。
4. 测定时, 先用蒸馏水 (或无水乙醇) + 工作液空白对照管调零, 然后测定各管 OD 值。
5. 绘制标准曲线并计算总胆固醇浓度。

Excel 绘制标准曲线步骤: 各标准管 OD 值为 y 轴, 标准品浓度为 x 轴。(1) 鼠标左键圈住数据, 点击做图向导, 选择-散点图-, 点击-完成-。(2) 鼠标右键点图上的某一点, 点击-添加趋势线-, 点击-选项-, 点击-显示公式-和-R²值-。

游离胆固醇测定: 请参见液体样本游离胆固醇酶法测定试剂盒货号 E1006、组织细胞游离胆固醇酶法测定试剂盒货号 E1016 说明书。

胆固醇酯测定: 在测定胆固醇酯含量时, 需要同时采用 E1005 和 E1006 两种试剂盒, 分别测定总胆固醇和游离胆固醇, 二者的差值即为胆固醇酯的含量。适于血液和某些细胞内胆固醇酯测定。

胆固醇酯在肝脏生成。血胆固醇酯降低和胆固醇酯/总胆固醇酯比值降低见于慢性肝病。胆道阻塞时, 血

胆固醇酯与总胆固醇浓度均升高但其比值正常。故有助于肝实质损害与单纯胆道阻塞的鉴别诊断。

需要注意的是: 这种由差值计算求得的胆固醇酯的值, 主要适合**血液样品**测定, 可能不很适合培养基、细胞内胆固醇酯测定。其原因主要与细胞内胆固醇酯和游离胆固醇的合成、转运、外流、储存、分解、再酯化等诸多动态生物过程的非线性的高度复杂性有关, 还与现有测量方法的局限性有关。另外, 胆固醇(酯)的含量以及代谢方式在不同类型的细胞内如肝细胞、巨噬细胞、肌肉细胞、成纤维细胞等存在巨大差异。有时以差值计算的胆固醇酯出现背离和偏差, 甚至为负值。如果出现这种情况, 建议在数据分析时采用胆固醇酯/总胆固醇比值, 而非胆固醇酯绝对值; 或者尝试用同位素标记方法、薄层层析、HPLC 等方法测定胆固醇酯, 或许会有改善。

说明:

1. 可微量调整样品与工作液体积比例。
2. 正常人血中总胆固醇参考值2.86~5.98mmol/L或 110~230mg/dl。
3. 维生素C>0.18g/L、血红蛋白>2g/L、胆红素>0.25g/L、强还原剂二硫苏糖醇、巯基乙醇等干扰测试。

以下仅仅列举部分使用普利莱总胆固醇测定试剂盒发表的 SCI 文章, 供参考。

- 1、 Tong L T, Zhong K, Liu L, et al. Effects of dietary hull-less barley β -glucan on the cholesterol metabolism of hypercholesterolemic hamsters[J]. Food chemistry, 2015, 169: 344-349.
- 2、 Tong L T, Zhong K, Liu L, et al. Effects of dietary wheat bran arabinoxylans on cholesterol metabolism of hypercholesterolemic hamsters[J]. Carbohydrate polymers, 2014, 112: 1-5.
- 3、 Hu X, Wang T, Li W, et al. Effects of NS lactobacillus strains on lipid metabolism of rats fed a high-cholesterol diet[J]. Lipids Health Dis, 2013, 12(67): 10.1186.
- 4、 Tong L T, Zhong K, Liu L, et al. Oat oil lowers the plasma and liver cholesterol concentrations by promoting the excretion of faecal lipids in hypercholesterolemic rats[J]. Food chemistry, 2014, 142: 129-134.
- 5、 Cui M, Xiao Z L, Sun B D, et al. Involvement of cholesterol in hepatitis B virus X protein-induced abnormal lipid metabolism of hepatoma cells via up-regulating miR-205-targeted ACSL4[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2014, 445(3): 651-655.
- 6、 Li S, Li Y, Ning H, et al. Calcium supplementation increases circulating cholesterol by reducing its catabolism via GPER and TRPC1-dependent pathway in estrogen deficient women[J]. International journal of cardiology, 2013, 168(3): 2548-2560.
- 7、 Cai D, Jia Y, Lu J, et al. Maternal dietary betaine supplementation modifies hepatic expression of cholesterol metabolic genes via epigenetic mechanisms in newborn piglets[J]. British Journal of Nutrition, 2014, 112(09): 1459-1468.
- 8、 Li H, Li H, Guo H, et al. Cholesterol suppresses adipocytic differentiation of mouse adipose-derived stromal cells via PPAR γ 2 signaling[J]. Steroids, 2013, 78(5): 454-461.
- 9、 Li H, Guo H, Li H. Cholesterol loading affects osteoblastic differentiation in mouse mesenchymal stem cells[J]. Steroids, 2013, 78(4): 426-433.
- 10、 Wu D M, He Z, Ma L P, et al. Increased DNA methylation of scavenger receptor class B type I contributes to inhibitory effects of prenatal caffeine ingestion on cholesterol uptake and steroidogenesis in fetal adrenals[J]. Toxicology and applied pharmacology, 2015, 285(2): 89-97.
- 11、 Liu Z W, Li X B, Li X W. Effects of Propylthiouracil-Induced Hypothyroidism on Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Rats Fed a High-Fat and High-Cholesterol Diet[J]. 2014.