血液高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）酶法测定试剂盒　　E1017

描述：血浆中的脂质以脂蛋白-胆固醇-甘油三酯复合物形式存在。高密度脂蛋白 HDL 主要在肝脏和小肠生成，其主要功能是将肝外组织的胆固醇通过血液运回肝脏，转化为胆汁酸或直接通过胆汁从肠道排出体外，具有抗动脉粥样硬化作用。临床常规血脂检验包括四项：总胆固醇(total cholesterol，TC)、低密度脂蛋白-胆固醇(low density lipoprotein-cholesterol，LDL-C)和高密度脂蛋白-胆固醇(high density lipoprotein-cholesterol，HDL-C)、甘油三酯(triglyceride，TG)。血浆总胆固醇包括 2/3 的胆固醇酯和 1/3 的游离胆固醇。HDL-C 的测定需要预先分离不同密度的脂蛋白复合物，再测定其中的胆固醇含量。

原理：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HDL分离方法和胆固醇测定方法，操作简便可靠，灵敏度高，检测范围 20~5000 μmol/L，重复性佳。采用CHOD-PAP终点法结合经典GPO Trinder酶学反应[1]：(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。(3) 反应过程产生过氧化氢。(4) 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。

组成：（250次）

(1) HDL捕获剂　13ml

(2) R1　40ml

(3) R2　10ml

(4) 5 mmol/L胆固醇标准品　0.5ml

4º C保存，6个月有效

样品准备：人和动物的自然凝固后血清、EDTA 抗凝血浆。不建议使用肝素抗凝。新鲜血液 4ºC 2000 g 离心 5 min 得到血浆，非抗凝血 4ºC 放置 2 小时得到血清。可 4ºC 存放数天或−20 ºC 半年。如超过线性范围用生理盐水 1:1~1:5 稀释后测定。

所需设备：酶标仪、生化分析仪、可见光分光光度计。最佳工作波长 550-555nm，如无此波长建议优先选用 570、530、490nm。比色杯光径 1cm。

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、36 μmol/L。通常设置稀释 4 个点/管即可，注意设置 0 浓度对照反应管。立即使用，用毕弃去。

1. HDL-胆固醇分离步骤

1.1. 取 50 μL 血清或血浆(样品体积范围 20-100 μL)

1.2. 加等体积 50 μL 的 HDL 捕获剂，振荡混匀。

1.3. 室温孵育 10 分钟。沉淀 10-30 分钟、室温或 4ºC 不影响结果，但条件要一致。

1.4. 2000 g 离心 20 分钟。离心温度 4～22 度均可，不同样品离心条件要一致。

1.5. 上清液体含 HDL-胆固醇。

2. HDL 胆固醇测定步骤：

2.1. 配制测定工作液: 按 4:1 比例，取 4 ml 试剂 R1 与 1 ml 试剂 R2 混合，立即使用。4ºC 保存<1 天，变色弃去。

2.2. 取 190 μl 测定工作溶液，加入微板孔内。

2.3. 加入步骤 1.5 制备的上清液 10μL。上清液体含 HDL-胆固醇，放置后如有絮状物应再次离心。标准品管的加样量也是 10 μl 标准品。反应总体积 200 μl。

2.4. 37ºC 20min (15~30min)。或 25ºC 室温反应 30 min 但灵敏度略低。反应平衡后颜色在 60 min 内稳定。

2.5. 先用蒸馏水空白管调零。然后测定各管 OD550 值。绘制标准曲线并计算总胆固醇浓度。Excel 作图步骤参考：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-R^2 值。

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。

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