

血液低密度脂蛋白/极低密度脂蛋白-胆固醇 (LDL/VLDL-C) 酶法测定试剂盒 E1018

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。由肝脏生成的极低密度脂蛋白复合物(VLDL), 因富含甘油三酯而密度很低; 随着其甘油三酯逐渐水解利用, VLDL 变成 IDL 复合物并失去 Apo E 和 Apo C2, 转变成富含 Apo B100 和胆固醇的 LDL 复合物。低密度脂蛋白 LDL 携带大量胆固醇, 与动脉粥样硬化形成正相关, 是导致动脉粥样硬化的危险因素。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。LDL/VLDL-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 $\mu\text{mol/L}$, 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) LDL/VLDL捕获剂 13ml

(2) R1 40ml

(3) R2 10ml

(4) 5 mmol/L胆固醇标准品 0.5ml

4°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 4°C 2000 g 离心 5 min 得到血浆, 非抗凝血 4°C 放置 2 小时得到血清。可 4°C 存放数天或-20 °C 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 $\mu\text{mol/L}$ 。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. LDL/VLDL -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 LDL/VLDL 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 4°C 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. 沉淀含有 LDL/VLDL-胆固醇。小心吸除上清, 再次 2000 g 离心 10 分钟, 弃尽上清。
- 1.6. 加入 100 μL PBS 或生理盐水 (初始血浆样品的 2 倍体积), 振荡重悬沉淀。。

2. LDL/VLDL-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。4°C 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 1.6 制备的上清液 10 μL 。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. 37°C 20min (15~30min)。或 25°C 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-R²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