

低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 检测试剂盒

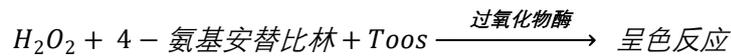
(货号: BC028 微板法)

一、测定意义及原理

[第一反应]



[第二反应]



二、试剂组成及配制 (96T)

试剂组成	规格	组份	浓度	保存条件
试剂一 (R1)	18mL*1 瓶	Tris	50mmol/L	2~8℃ 避光保存
		多聚阴离子	0.5%	
		Emulgen B-66	0.5%	
		4-AAP	1 mmol/L	
		NaN ₃	1‰	
试剂二 (R2)	6mL *1 瓶	胆固醇酯酶	5kU/L	
		胆固醇氧化酶	5kU/L	
		过氧化物酶	2kU/L	
		EAPAS	0.5mmol/L	
		NaN ₃	1‰	
		TritonX-100	1%	
标准品	粉剂*1 支	胆固醇	见标签	
附送 96 孔平底酶标板一块				室温放置



三、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/分钟, 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:

1、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。

2、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/分钟, 离心 10min, 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直接测定。也可采用裂解液裂解(推荐 TritonX-100, 1~2%, 裂解液 30~40 分钟), 裂解好的液体不离心直接测定。

注: 一般建议细胞密度在 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	标准孔	样本孔
蒸储水(μL)	2.5		
标准品(μL)		2.5	
样本(μL)			2.5
R1 (μL)	180	180	180
轻轻振荡孔板混匀, 37°C 孵育 5 分钟, 波长 600nm,酶标 仪测定各孔吸光度值 A1			
R2 (μL)	60	60	60
轻轻振荡混匀, 37°C 孵育 5 分钟, 波长 600nm,酶标仪测定各孔吸光度值 A2. 计算 $\Delta A = A2 - A1$			

全自动生化分析仪上机操作			
样本量/水	Sample Volume	μL	2.5
R1	Reagent	μL	180
37°C 孵育 5 分钟, 波长 600nm,测定光吸收值 A1			
R2	Reagent	μL	60
37°C 孵育 5 分钟, 波长 600nm,测定光吸收值 A2			
主波长	Main wavelength	nm	546
反应类型	Reaction type		终点法
反应方向	Reaction direction		升反应(+)



四：计算公式：

1、血清等液体样本计算公式：

酶标仪操作：

$$\text{LDLC 含量 (mmol/L)} = \frac{\Delta A_{\text{样品}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准品}}$$

全自动生化分析仪操作：

$$\text{LDLC 含量 (mmol/L)} = \frac{\Delta A_{\text{样品}}}{\Delta A_{\text{标准}}} \times C_{\text{标准品}}$$

a、取正常人血浆 2.5μL,按操作表操作,得空白孔吸光度 A1 为 0.0533,空白孔吸光度 A2 为 0.0576,标准孔吸光度 A1 为 0.0842,标准孔吸光度 A2 为 0.5418,样本孔吸光度 A1 为 0.0682,样本孔吸光度 A2 为 0.2083,则计算如下：

$$\text{LDLC 含量 (mmol/L)} = \frac{0.1401 - 0.0043}{0.4576 - 0.0043} \times 4.3 = 1.2882 \text{ mmol/L}$$

b、取大鼠血清 2.5μL,按操作表操作,得空白孔吸光度 A1 为 0.0533,空白孔吸光度 A2 为 0.0576,标准孔吸光度 A1 为 0.0842,标准孔吸光度 A2 为 0.5418,样本孔吸光度 A1 为 0.0605,样本孔吸光度 A2 为 0.1121,则计算如下：

$$\text{LDLC 含量 (mmol/L)} = \frac{0.0516 - 0.0043}{0.4576 - 0.0043} \times 4.3 = 0.4487 \text{ mmol/L}$$

2、组织、细胞样本计算公式：(组织样本不建议使用生化仪测定)

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 BC016)：

酶标仪比色：

$$\text{LDLC 含量 (mmol/gprot)} = \frac{\Delta A_{\text{样品}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准品}} \div \text{Cpr}$$

Cpr: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)：

酶标仪操作：

$$\text{LDLC 含量 (mmol/g组织)} = \frac{\Delta A_{\text{样品}}}{\Delta A_{\text{标准}}} \times C_{\text{标准品}} \div \frac{W}{V_{\text{总样}}}$$

W: 样本质量(g); $V_{\text{总样}}$: 匀浆液总体积(L)

注：细胞样本测定时可 将上式中的 $\frac{W}{V_{\text{总样}}}$ 替换为细胞前处理时的细胞密度，

a、取 10%小鼠肝匀浆 2.5μL,按操作表操作,得空白孔吸光度 A1 为 0.0533,空白孔吸光度 A2 为 0.0576,标准孔吸光度 A1 为 0.0842,标准孔吸光度 A2 为 0.5418,样本孔吸光度 A1 为 0.1234,样本孔吸光度 A2 为 0.1682,同时测得 10%小鼠肝匀浆蛋白浓度为 12.0121gprot/L,计算如下：

$$\text{LDLC 含量 (mmol/gprot)} = \frac{0.0448 - 0.0043}{0.4576 - 0.0043} \times 4.3 \div 12.0121 = 0.03199 \text{ mmol/gprot}$$



五、技术参数:

项目序号	指标名称	指标要求
1	试剂空白管	$\Delta A \leq 0.050$ (光径 0.5cm)
2	灵敏度: 2.6mmol/L	吸光度差值 $0.180 \leq \Delta A \leq 0.280$
3	试剂盒批间 CV	相对偏差 $\leq 10\%$
4	精密度	变异系数 $\leq 8\%$
5	线性范围 0~10.4 mmol/L	$R^2 \geq 0.995$
6	稳定性	原包装整体放置 4°C 避光保存, 有效期 12 个月。开启后 4°C 避光保存, 可稳定放置 1 个月

六、操作注意点:

- 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; 如样品含量较低也可以适当加大进样量 (如 5 或 10ML), 同时要将标准品稀释相应的倍数后和样本保持相同的加样量。
- 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全自动生化分析仪的要求, 按比例增减。
- 5、举例采用标准品为不同批次, 浓度不同。

