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 测定需要预先分离不同密度的脂蛋白-胆固醇复合物，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-胆固醇复合物相分离原理方法和氧化酶法胆固醇测定方法，简便可靠，灵敏度高，检测范围20~5000 µmol/L，重复性佳。原理基于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) 胆固醇标准品粉末　1管

4ºC保存，6个月有效

样品准备：(1) 使用人或动物的自然凝固血清：(1)非抗凝血浆 4ºC 放置 2 小时得到血清、(b) 新鲜血液 4ºC 2000 g 离心 5 min 得到的血浆。(2) 或使用 EDTA 或枸橼酸钠抗凝血浆，参照相关制备方法。因为肝素可释放脂蛋白脂肪酶活性而影响血浆甘油三酯和胆固醇酯水解, 不建议使用肝素抗凝血浆。新鲜制备血液样品测定效果佳，可 4ºC 存放数天测定或−20 ºC 不超过半年。注意(1)即使长期冻存下生物分子亦必将自然降解导致结果不准，(2)如测定结果超过线性范围用生理盐水 1:1~1:5 稀释样品后测定。

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。

自备试剂：无水乙醇（浓度≥99.5%）

标准品溶解：

初次使用前，请将标准品粉末 12000rpm 离心 1min，加入 0.5ml 无水乙醇，充分涡旋振荡，混合均匀，即为 5 mmol/L 胆固醇标准品 0.5 ml，密封保存。

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-胆固醇的相分离(phase separation)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，最好即时测定。按照“相分离”原理，较长时放置可能出现絮状物是 non-HDL fraction 疏水相组分包括部分血浆蛋白，使用前应再次 2000g 离心 5 分钟，取上清测定。

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. 加入上述步骤 1.5 制备的上清液 10µL。上清液体含 HDL-胆固醇，注意较长期放置后如有絮状物应再次 2000g 离心 5min 取上清测定。标准品管加样量也是 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