液体样本游离胆固醇酶法测定试剂盒 E1006

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 μmol/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]，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。

测定样本范围： 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 试剂 R1 与 1 ml 试剂 R2 混合即可，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 μmol/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、游离胆固醇测定：

1.取 180 μl（180~190μl）测定工作溶液。
2.在各工作液中，分别加入 20 μl (10~20μl) 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 但灵敏度会略微降低。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游离胆固醇浓度。

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-R^2 值-。

总胆固醇测定：请参见液体样本总胆固醇法测定试剂盒货号 E1005、组织细胞总胆固醇酶法测定试剂盒货号 E1015 说明书。

胆固醇酯测定：在测定胆固醇酯含量时，需要同时采用以上 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游离胆固醇测定试剂盒发表的 SCI 文章，供参考。

1、Yao S, Zong C, Zhang Y, et al. Activating transcription factor 6 mediates oxidized LDL-induced cholesterol accumulation and apoptosis in macrophages by up-regulating CHOP expression[J]. Journal of atherosclerosis and thrombosis, 2013, 20(1): 94-107.

2、Zou J, Xu L, Ju Y, et al. Cholesterol depletion induces ANTXR2-dependent activation of MMP-2 via ERK1/2 phosphorylation in neuroglioma U251 cell[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2014, 452(1): 186-190.

3、Li H, Li H, Guo H, et al. Cholesterol suppresses adipocytic differentiation of mouse adipose-derived stromal cells via PPARγ2 signaling[J]. Steroids, 2013, 78(5): 454-461.

4、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.

5、Li H, Guo H, Li H. Cholesterol loading affects osteoblastic differentiation in mouse mesenchymal stem cells[J]. Steroids, 2013, 78(4): 426-433.

6、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.

7、Zhu T, Ai Q, Mai K, et al. Feed intake, growth performance and cholesterol metabolism in juvenile turbot (Scophthalmus maximus L.) fed defatted fish meal diets with graded levels of cholesterol[J]. Aquaculture, 2014, 428: 290-296.

8、Guo L, Tong L T, Liu L, et al. The cholesterol-lowering effects of oat varieties based on their difference in the composition of proteins and lipids[J]. Lipids in health and disease, 2014, 13(1): 182.

9、Zhao X, Gao M, He J, et al. Perilipin1 Deficiency in Whole Body or Bone Marrow-Derived Cells Attenuates Lesions in Atherosclerosis-Prone Mice[J]. PloS one, 2015, 10(4).

10、Wu Q, Li J, Zhao T, et al. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibits 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in the presence of glycerol[J]. Pakistan journal of pharmaceutical sciences, 2014, 27(6): 1905-1910.