

Amplex Red胆固醇与胆固醇酯检测试剂盒

产品货号：26979

产品规格：100次/500次

产品简介：

尚宝研发的Amplex Red胆固醇与胆固醇酯检测试剂盒(Amplex Red Cholesterol and Cholesteryl Ester Assay Kit)是一种基于探针Amplex Red，利用荧光或吸光度检测，快速、高灵敏地对血清、血浆、组织或细胞样品、尿液、细胞培养上清等样品中游离胆固醇、总胆固醇和胆固醇酯含量进行检测的试剂盒。通常0.5-5μl血清或血浆样品就足够用于本试剂盒的荧光法检测。

本试剂盒检测灵敏度高，线性范围宽，样品用量少。本试剂盒采用吸光度检测时，在5-500μM浓度范围内有良好的线性关系；采用荧光检测时，在0.5-50μM浓度范围内有良好的线性关系。使用本试剂盒进行荧光法检测时，检测灵敏度会显著提高，可以使用更少量的样品。

本试剂盒检测方法灵活，检测速度快，适用范围广。本试剂盒不仅可以用荧光检测，也可以用吸光度检测，荧光检测比吸光度检测灵敏度约高10倍。整个检测过程约30分钟即可完成。本试剂盒可用于小鼠、大鼠、人等的血清、血浆、尿液、细胞培养上清以及组织或细胞样品的检测。本试剂盒不仅适合少量样本的检测，也非常适合高通量筛选(High-throughput screening)的自动化操作系统。

胆固醇(Cholesterol)，又称胆甾醇，是一种环戊烷多氢菲的衍生物，分子式为 $C_{27}H_{46}O$ ，分子量为386.6535。胆固醇广泛存在于动物体内，尤以脑及神经组织中最为丰富，在肾、脾、皮肤、肝和胆汁中含量也比较高。胆固醇的溶解性与脂肪类似，不溶于水，易溶于乙醚、氯仿等有机溶剂。胆固醇在血液中存在与脂蛋白中，其存在形式包括高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和极低密度脂蛋白胆固醇(VLDL-C)。在血液中存在的胆固醇绝大多数都是和脂肪酸结合的胆固醇酯(Cholesteryl ester)，仅有少量的胆固醇是以游离状态存在的。

胆固醇是动物组织细胞不可缺少的重要物质，它不仅是哺乳动物细胞膜的重要组成部分，同时也是合成胆汁酸，维生素D以及甾体激素的重要原料。胆固醇广泛参与胞内转运、细胞信号转导等细胞功能，并维持着膜结构的流动性。在正常情况下，机体在肝脏中合成或从食物中摄取的胆固醇，转化为甾体激素或成为细胞膜的组分，并使血液中胆固醇的浓度保持相对稳定。当肝脏发生严重病变时，血液胆固醇浓度会降低。而在黄疸性梗阻和肾病综合征患者体内，血液胆固醇浓度往往会升高。高密度脂蛋白有助于清除细胞中的胆固醇，而低密度脂蛋白超标一般被认为是心血管疾病的前兆。由于血液总胆固醇含量的升高与动脉粥样硬化、心血管疾病存在一定的关联性。所以对血液中胆固醇含量进行检测具有重要的临床意义。

本试剂盒中的Amplex Red是一种对 H_2O_2 高度敏感的荧光探针。在辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP)存在的情况下，Amplex Red能与 H_2O_2 1:1反应，产生强烈的红色荧光物质试卤灵(Resorufin)。试卤灵的最大激发波长为571nm，最大发射波长为585nm，并且在激发波长处有很强的可见光吸收。因此本试剂盒可以用荧光和吸光度两种方法来进行检测。

本试剂盒的检测原理如图1所示。胆固醇酯(Cholesteryl ester)首先在胆固醇酯酶(Cholesterol esterase)的催化作用下水解生成游离胆固醇(Free cholesterol)和脂肪酸(Fatty acids, FA)，游离胆固醇进一步在胆固醇氧化酶(Cholesterol oxidase, Cho)的作用下和氧气发生氧化反应生成 H_2O_2 和胆甾烯酮(Cholestenone)，再通过检测 H_2O_2 与Amplex Red的反应产物试卤灵的荧光强度或吸光度来最终检测总胆固醇的含量。试卤灵的荧光强度和吸光度与胆固醇的含量成正比。如果检测时不使用胆固醇酯酶，那么检测出来的就是游离胆固醇的含量。测定出总胆固醇和游离胆固醇的含量，二者相减就可以计算出胆固醇酯的含量。

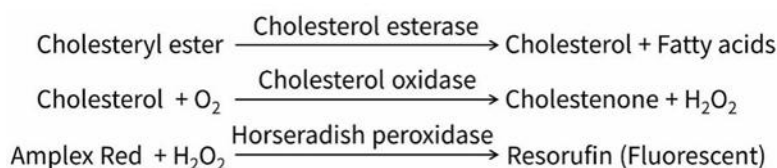


图1. 尚宝Amplex Red胆固醇与胆固醇酯检测试剂盒检测胆固醇与胆固醇酯的原理图。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

本试剂盒提供了胆固醇标准溶液，可以通过设置标准曲线，从而计算出样品中的胆固醇、胆固醇酯和总胆固醇含量。本试剂盒对胆固醇标准品的检测效果参考图2。

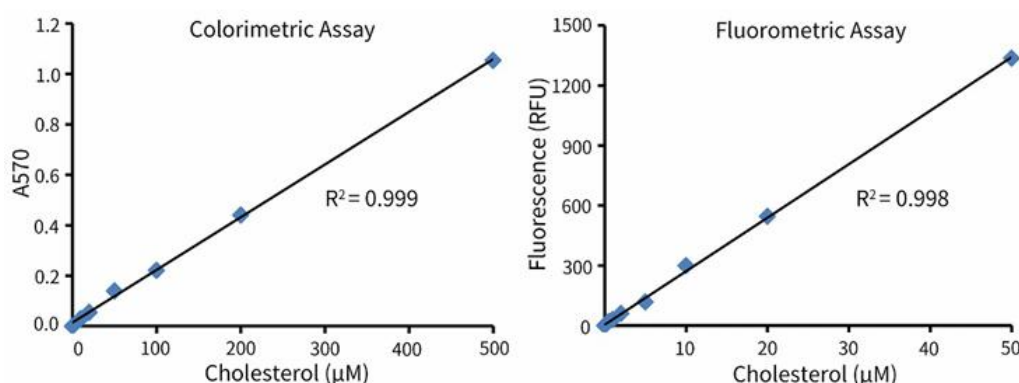


图2. 尚宝Amplex Red胆固醇与胆固醇酯检测试剂盒检测胆固醇的标准曲线。左图为吸光度检测，右图为荧光检测。本产品采用吸光度检测时，在5-500μM浓度范围内有良好的线性关系；采用荧光检测时，在0.5-50μM浓度范围内有良好的线性关系。实测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

本试剂盒提供了便捷的检测裂解液。对于细胞或组织样品的制备，可以用本试剂盒提供的Buffer A for Metabolic Assay，也可以用异丙醇、甲醇/氯仿(1:2, v/v)等有机溶剂。经测试发现，本试剂盒提供的检测裂解液所制备样品的检测效果与异丙醇或甲醇/氯仿(1:2, v/v)所制备的样品的检测效果相当。使用异丙醇制备的细胞或组织样品，还可以用于甘油三酯、甘油和游离脂肪酸的检测，因此优先推荐使用异丙醇。如果样品仅用于检测胆固醇、胆固醇酯和游离脂肪酸的检测，不用于甘油三酯和甘油的检测，优先推荐使用Buffer A for Metabolic Assay。如果使用异丙醇或者甲醇/氯仿(1:2, v/v)所制备的样品，样品最终用异丙醇溶解后，样品检测时如果异丙醇的体积不超过整个检测体系的10% (即100μl检测体系中不超过10μl)，不会对吸光度或荧光检测产生显著影响。

本试剂盒提供的检测裂解液有一定的通用性。使用本试剂盒中的Buffer A for Metabolic Assay裂解获得的细胞或组织样品，也可以用于尚宝生产的其它代谢类试剂盒中同样使用Buffer A for Metabolic Assay进行裂解的样品检测，通用性强；而且还可用于检测蛋白浓度、进行SDS-PAGE或一些较易溶解蛋白的Western检测。

按照使用说明操作，本试剂盒小包装可以进行100次检测，中包装可以进行500次检测。

产品组成:

产品名称	100次	500次	保存条件
Buffer A for Metabolic Assay	15ml	75ml	-20℃
胆固醇检测缓冲液	15ml	75ml	-20℃
Amplex Red	200μl	1ml	-20℃，避光
胆固醇酯酶	200μl	1ml	-20℃
酶混合物	200μl	1ml	-20℃
胆固醇标准溶液(5mM)	100μl	500μl	-20℃，避光

使用说明:

1. 样品的准备:

- 血液样品的准备: 对于血清样品，将全血在常温如25℃下放置30分钟至2小时，不要剧烈摇晃以免溶血，待全血自然凝固并析出血清后，4℃约1000-2000×g离心10分钟，取黄色上清即得血清，注意不要吸取白色或淡黄色沉淀；对于血浆样品，将全血用肝素或者EDTA进行抗凝，4℃约1000-2000×g离心10分钟，取黄色或淡黄色上清即得血浆，注意不要吸取白色沉淀。血清和血浆都需置于冰上，如果不能立即检测，也可以分装并短期保存于-20℃或-80℃。对于冻存的样品，在检测前解冻后冰浴存放备用，使用前必须混匀。后续采用吸光度法检测样品时，通常每个样品需要使



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

用1-50 μ l；采用荧光法检测样品时，通常每个样品需要使用0.5-5 μ l。

- b. 细胞或组织样品的准备：对于培养的贴壁细胞，PBS洗涤一次并吸净残留液体。对于培养的悬浮细胞，先适当离心（如100-500 $\times$ g, 5分钟）收集细胞到离心管内，弃上清并吸净残留液体。按照每20-100万细胞加入100-200 μ l的比例加入Buffer A for Metabolic Assay或异丙醇，适当吹打。对于贴壁细胞适当吹打使细胞脱离培养器皿并转移至离心管中。对于组织样品，按照每10-20mg组织加入100-200 μ l的比例加入Buffer A for Metabolic Assay或异丙醇。对于培养的细胞和组织，推荐把体积控制在100-200 μ l使用高通量组织研磨仪(1.5/2ml $\times$ 48)、手持式组织研磨仪或玻璃匀浆器在约4 $^{\circ}$ C或冰浴等低温条件下进行匀浆；也可以考虑把体积放大到400-500 μ l左右，采用瓷珠机械震荡的方式进行匀浆；或者也可以使用常规的玻璃匀浆器进行匀浆(建议尽量使用较小的玻璃匀浆器，以便于把样品的体积控制在较小体积范围内)。4 $^{\circ}$ C约12,000 $\times$ g离心3-5分钟，取上清用于后续检测。

注1：异丙醇制备的样品使用检测缓冲液至少稀释5倍后(即50 μ l待测样品中异丙醇的含量不高于20%)再用于后续检测。

注2：以上所有操作均需在4 $^{\circ}$ C或冰上操作。制备好的细胞或组织样品如果不能立即检测，可以-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C冻存。

注3：异丙醇容易挥发，由于操作时间过长导致异丙醇的挥发，后续可以将异丙醇补足至初始体积，然后再进行样品的检测；所有样品的挥发程度接近的情况下，可以统一不再补足挥发掉的异丙醇，但计算样品中的浓度时需要考虑挥发掉的异丙醇的体积。如果样品已经用甲醇/氯仿或者氯仿抽提制备，可以充分干燥后用异丙醇把样品溶解，然后用检测缓冲液至少稀释5倍后再用本试剂盒进行检测。

- c. 细胞培养上清样品的准备：对于贴壁细胞，直接吸取培养液；对于悬浮细胞，离心后吸取培养液。

2. 试剂盒的准备：

- a. 融解胆固醇标准溶液(5mM)和检测缓冲液，平衡至室温后混匀备用。胆固醇标准溶液(5mM)如果有油脂析出，需要在50-80 $^{\circ}$ C水浴孵育20分钟，使胆固醇标准溶液(5mM)完全溶解。其它试剂存放于冰浴备用，使用完毕后宜立即按照试剂盒要求的条件保存。

- b. 胆固醇检测工作液的配制：按照每个检测反应50 μ l的体积配制适量的胆固醇检测工作液。

(a) 总胆固醇的检测：均匀混合44 μ l检测缓冲液(Cholesterol Assay Buffer)、2 μ l Amplex Red、2 μ l胆固醇酯酶 (Cholesterol Esterase)、2 μ l酶混合物(Enzyme Mix)，即可配制成50 μ l总胆固醇检测工作液(Total Cholesterol Working Solution)。根据待检测样品(包括标准品)的数量，配制适量的总胆固醇检测工作液。具体配制方法参考下表。

Samples	1	10	20	50
Cholesterol Assay Buffer (μ l)	44	440	880	2200
Amplex Red (μ l)	2	20	40	100
Cholesterol Esterase (μ l)	2	20	40	100
Enzyme Mix (μ l)	2	20	40	100
Total Cholesterol Working Solution (μ l)	50	500	1000	2500

(b) 游离胆固醇的检测：均匀混合46 μ l检测缓冲液(Cholesterol Assay Buffer)、2 μ l Amplex Red、2 μ l酶混合物(Enzyme Mix)，即可配制成50 μ l游离胆固醇检测工作液(Free Cholesterol Working Solution)。根据待检测样品(包括标准品)的数量，配制适量的游离胆固醇检测工作液。具体配制方法参考下表。

Samples	1	10	20	50
Cholesterol Assay Buffer (μ l)	46	460	920	2300
Amplex Red (μ l)	2	20	40	100
Enzyme Mix (μ l)	2	20	40	100
Free Cholesterol Working Solution (μ l)	50	500	1000	2500

(c) 胆固醇酯的检测：按照(a)和(b)分别检测总胆固醇和游离胆固醇的含量，后续从总胆固醇的含量中减去游离胆固醇的含量即可获得胆固醇酯的含量。

(d) 配制好的胆固醇检测工作液如果置于4 $^{\circ}$ C或冰浴避光保存，可以在当天使用，但建议尽量现配现用。

注：由于酶溶液的用量较少且易沉降，必须注意在使用前先轻轻离心一下，然后适当混匀后再使用。胆固醇标准品为胆固醇酯和游离胆固醇的混合物，在制作标准曲线时，加入标准品孔中的检测工作液必须加胆固醇酯酶，即按照总胆固醇的检测的工作液进行配制，以确保胆固醇标准品全部转换成胆固醇。

3. 样品测定：



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

- a. 胆固醇标准曲线设置(吸光度检测或荧光检测,可选取其中的一种,对于样品量较少的情况,优先推荐采用荧光检测)。
- (a) 吸光度检测:取20 μ l胆固醇标准溶液(5mM),加入180 μ l检测缓冲液、裂解液或含适量异丙醇的检测缓冲液(如果检测血液、上清等无需处理的样品,可以使用检测缓冲液;如果检测Buffer A for Metabolic Assay制备的细胞或组织样品,可以使用Buffer A for Metabolic Assay;如果检测异丙醇制备的细胞或组织样品,可以更加精准地使用和样品中异丙醇含量相同的检测缓冲液,但50 μ l标准品中异丙醇的含量不得超过20%),混匀,配制成浓度为500 μ M的胆固醇标准溶液。分别取500 μ M的胆固醇标准溶液0、1、2、5、10、20、50 μ l加入96孔板的标准品孔中,并用对应的检测缓冲液、裂解液或含适量异丙醇的检测缓冲液补足到50 μ l,此时,标准曲线的浓度分别为0、10、20、50、100、200、500 μ M。

注:吸光度检测时建议使用透明96孔板。

(b) 荧光检测:取10 μ l胆固醇标准溶液(5mM),加入990 μ l检测缓冲液、裂解液或含适量异丙醇的检测缓冲液(如果检测血液、上清等无需处理的样品,可以使用检测缓冲液;如果检测Buffer A for Metabolic Assay制备的细胞或组织样品,可以使用Buffer A for Metabolic Assay;如果检测异丙醇制备的细胞或组织样品,可以更加精准地使用和样品中异丙醇含量相同的检测缓冲液,但50 μ l标准品中异丙醇的含量不得超过20%),混匀,配制成浓度为50 μ M的胆固醇标准溶液。分别取50 μ M的胆固醇标准溶液0、1、2、5、10、20、50 μ l加入96孔板的标准品孔中,用对应的检测缓冲液、裂解液或含适量异丙醇的检测缓冲液补足到50 μ l,此时,标准曲线的浓度分别为0、1、2、5、10、20、50 μ M。

注:荧光检测时建议使用96孔黑板。

- b. 加入1-50 μ l稀释后的样品到96孔板样品孔中,并相应地再加入检测缓冲液、裂解液或含适量异丙醇的检测缓冲液至样品孔中,补足到50 μ l。同时设置仅含检测缓冲液、裂解液或含适量异丙醇的检测缓冲液的孔为空白对照。

注:为确保数值在标准曲线范围内,采用吸光度检测时,建议将组织样品用Buffer A for Metabolic Assay或含适量异丙醇的检测缓冲液稀释20倍左右,血清样品用检测缓冲液稀释100倍左右;采用荧光检测时,组织样品稀释5-100倍,血清样品稀释200倍左右,也可同时设定多个稀释倍数;可以进行预实验确定样品的大致浓度,如果数值不在标准曲线范围内,请调整样品的稀释倍数或者增加样品的量。样品总稀释倍数记录为n(包括步骤1b中的稀释倍数。例如1b中的稀释倍数为5,本步骤中又对样品进行了10倍稀释,加入的“稀释后的样品”为25 μ l,则 $n=5\times10\times50/25=100$)。注意:用异丙醇制备的细胞或组织样品,检测时50 μ l样品中的异丙醇含量不能超过20%,即相当于最终检测体系中的浓度不会超过10%。

- c. 各孔加入相应的胆固醇检测工作液50 μ l,混匀,37 $^{\circ}$ C避光反应30分钟。

注:如果由于样品中胆固醇或胆固醇酯含量偏低而导致吸光度偏低或荧光偏弱,可适当延长反应时间;对于胆固醇酯的检测,如果胆固醇酯的含量偏高,建议延长反应时间至60分钟或更长时间以确保胆固醇酯的充分水解,或者适当稀释样品。

- d. 如果使用吸光度检测,测定A570;如果使用荧光检测,设置激发波长为560nm、发射波长为590nm进行荧光强度检测。

- e. 建立标准曲线,并计算样品中总胆固醇/游离胆固醇的浓度(A),如果样品的背景对照孔信号比较高,样品的信号值应减去样品背景对照孔的信号值。胆固醇标准曲线可以参考图2,吸光度检测在5-500 μ M浓度范围内有良好的线性关系,荧光检测在0.5-50 μ M浓度范围内有良好的线性关系。总胆固醇/游离胆固醇浓度的计算公式如下:

$$C(\mu\text{M}) = A \times n$$

注:A为步骤3e根据标准曲线确定的胆固醇浓度(μ M);

n为步骤3b样品总稀释倍数。

总胆固醇的含量减去游离胆固醇的含量即可获得胆固醇酯的含量;

也可以根据胆固醇的分子量386.7计算出质量浓度($\mu\text{g/ml}$) = $C \times 0.3867$ 。

注意事项:

1. 本试剂盒如果用于细胞或组织样品的检测,可以用试剂盒提供的Buffer A for Metabolic Assay或自备的异丙醇、甲醇/氯仿(1:2, v/v)进行样品的制备。优先推荐使用异丙醇。用异丙醇制备的细胞或组织样品,可以用于胆固醇和胆固醇酯、游离脂肪酸、甘油三酯和甘油的检测。如果样品仅用于检测胆固醇和胆固醇酯、游离脂肪酸的检测,优先推荐使用Buffer A for Metabolic Assay。为减少稀释液产生的荧光背景带来的误差,标准品的稀释液应该根据样品制备所



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话:400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

用的溶液来确定。当样品为Buffer A for Metabolic Assay制备的细胞或组织样品时，应使用Buffer A for Metabolic Assay稀释；当样品为异丙醇制备的细胞或组织样品时，可以使用和样品中异丙醇含量相同的胆固醇检测缓冲液(后续简称检测缓冲液)稀释；当样品为血液等其它样品时，宜使用检测缓冲液稀释。

2. Amplex Red在空气中不太稳定，开启后应尽快使用，且在使用过程中一定要注意适当避光。
3. Amplex Red的反应产物在还原剂的存在下会很不稳定，因此最终反应体系中的二硫苏糖醇(DTT)、 β -巯基乙醇或类似还原剂的浓度应低于 $10\mu\text{M}$ 。
4. 请确保反应体系的pH值在7-8之间，否则会影响Amplex Red的稳定性和荧光值。
5. Buffer A for Metabolic Assay和检测缓冲液需要完全解冻并平衡至室温后再使用，否则会影响检测结果。其它试剂(除胆固醇标准溶液(5mM)外)使用时应在冰上进行。
6. 胆固醇标准溶液如果有油脂析出会影响后续反应，需要在 $50-80^{\circ}\text{C}$ 水浴孵育20分钟，使胆固醇标准溶液完全溶解。胆固醇标准溶液配制在无水乙醇中，由于无水乙醇容易挥发，水浴溶解过程中请注意密封。
7. 血清、血浆等样品如果在 4°C 保存，保存时间不得超过2周，否则会影响检测结果的准确性。通常血清样品宜在 -20°C 保存， -80°C 保存更佳。
8. 当样品为细胞或组织的异丙醇抽提物或溶解物时，应使用检测缓冲液至少稀释5倍，使 $50\mu\text{l}$ 样品中的异丙醇含量不高于20%，即相当于总的 $100\mu\text{l}$ 检测体系中异丙醇的含量不高于10%，此时本试剂盒才能正常工作。
9. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
10. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

保存条件:

-20°C 保存，一年有效。其中Amplex Red、酶混合物、胆固醇标准溶液须避光保存。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>