

脂蛋白酯酶（Lipoprotein lipase, LPL）试剂盒说明书

微量法 100T/48S

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

脂蛋白酯酶是脂肪细胞、心肌细胞、骨骼肌细胞、乳腺细胞及巨噬细胞等实质细胞合成的一种酶，可催化甘油三酯水解为脂肪酸和单酸甘油酯，以供组织氧化供能和贮存，并在不同的组织表现出不同的生理意义。

测定原理：

脂蛋白酯酶水解 4-硝基苯棕榈酸酯产生 4-硝基苯酚，在 400nm 有特征吸收峰。

自备实验用品及仪器：

天平、冷冻离心机、研钵、水浴锅、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 105mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 4mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂三：液体 10mL×1 瓶，4℃ 保存。

样品处理：

1. 组织：按照质量（g）：试剂一体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g，加入 1mL 试剂一）加入试剂一，冰浴匀浆后于 4℃，10000g 离心 10min，取上清待测。
2. 细胞：按照细胞数量（ 10^4 个）：试剂一体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一）加入试剂一，冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后于 4℃，10000g 离心 10min，取上清待测。
3. 血清：直接测定。

测定操作：

	对照管	测定管
样品（ μL ）	20	20
试剂一（ μL ）	80	
试剂二（ μL ）		80
混匀，45℃ 水浴 10min		
试剂三（ μL ）	100	100
充分混匀，25℃ 静置 2min，于微量石英比色皿/96 孔板，测定 400nm 处吸光值，记为 A 对照管和 A 测定管， $\Delta A = A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}$		

计算公式：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线： $y = 0.0581x - 0.0169$ ， $R^2 = 0.9982$

1. 按照蛋白浓度计算

酶活性定义: 在 45℃, pH7.5 条件下, 每毫克蛋白每分钟水解产生 1 μ mol 4-硝基苯酚为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{LPL 活性 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A + 0.0169) \div 0.0581 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 17.21 \times (\Delta A + 0.0169) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

酶活性定义: 在 45℃, pH7.5 条件下, 每克组织每分钟水解产生 1 μ mol 4-硝基苯酚为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{LPL 活性 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.0169) \div 0.0581 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 17.21 \times (\Delta A + 0.0169) \div W \end{aligned}$$

3. 按照细胞数量计算

酶活性定义: 在 45℃, pH7.5 条件下, 每 10⁴ 个细胞每分钟水解产生 1 μ mol 4-硝基苯酚为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{LPL 活性 } (\mu\text{mol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A + 0.0169) \div 0.0581 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 17.21 \times (\Delta A + 0.0169) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

4. 按照液体体积计算

酶活性定义: 在 45℃, pH7.5 条件下, 每毫升血清每分钟水解产生 1 μ mol 4-硝基苯酚为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{LPL 活性 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) &= (\Delta A + 0.0169) \div 0.0581 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 17.21 \times (\Delta A + 0.0169) \end{aligned}$$

V 反总: 反应总体积, 0.2mL; V 样: 反应体系中加入样本体积, 0.02mL; W: 样本质量, g; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 10min

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

标准曲线: $y = 0.029x - 0.0169$, $R^2 = 0.9982$

1. 按照蛋白浓度计算

酶活性定义: 在 45℃, pH7.5 条件下, 每毫克蛋白每分钟水解产生 1 μ mol 4-硝基苯酚为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{LPL 活性 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A + 0.0169) \div 0.029 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 34.42 \times (\Delta A + 0.0169) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

酶活性定义: 在 45℃, pH7.5 条件下, 每克组织每分钟水解产生 1 μ mol 4-硝基苯酚为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{LPL 活性 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.0169) \div 0.029 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 34.42 \times (\Delta A + 0.0169) \div W \end{aligned}$$

3. 按照细胞数量计算

酶活性定义: 在 45℃, pH7.5 条件下, 每 10⁴ 个细胞每分钟水解产生 1 μ mol 4-硝基苯酚为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{LPL 活性 } (\mu\text{mol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A + 0.0169) \div 0.029 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 34.42 \times (\Delta A + 0.0169) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

4. 按照液体体积计算

酶活性定义: 在 45℃, pH7.5 条件下, 每毫升血清每分钟水解产生 1 μ mol 4-硝基苯酚为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{LPL 活性 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) &= (\Delta A + 0.0169) \div 0.029 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 34.42 \times (\Delta A + 0.0169) \end{aligned}$$

V 反总: 反应总体积, 0.2mL; V 样: 反应体系中加入样本体积, 0.02mL; W: 样本质量, g; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 10min

注意事项:

1. 试剂三加入混匀后静置两分钟立即测定, 否则影响吸光值。
2. 吸光值过高或者测定结果不稳定, 则将酶液进行适当的稀释, 并在计算公式中乘以稀释倍数。