

总脂酶[脂蛋白脂酶(LPL)、肝脂酶(HL)]测定试剂盒

比色法: 50 管/24 样

一、测定意义:

脂蛋白脂酶(Lipoprotein Lipase LPL)存在肝外组织毛细血管内皮细胞表面,它主要催化血浆中乳糜微粒(CM)和极低密度脂蛋白(VLDL)中的甘油三酯(TG)水解,在乳糜微粒(CM)及极低密度脂蛋白(VLDL)的降解中发挥重要作用。肝脂酶(Hepatic Lipase HL)则仅存在肝内皮细胞表面,它主要在中密度脂蛋白(LDL)和高密度脂蛋白(HDL)代谢中起重要作用。

二、试剂组成与配制:

	组份	50 管/24 样	100 管/48 样	保存
试剂一	粉剂	粉剂×2 支	粉剂×4 支	4℃保存 3 个月
	溶剂	5ml×1 瓶	10ml×1 瓶	4℃保存 3 个月
试剂一的配制: 用时每支粉剂加溶剂 1.5ml, 充分混匀, 4℃冰箱保存。				
试剂二	溶液	6ml×1 瓶	6ml×2 瓶	4℃保存 3 个月
试剂三	溶液	6ml×1 瓶	6ml×2 瓶	4℃保存 3 个月
试剂四	甲液	0.5ml×1 支	0.5ml×1 支	4℃保存 3 个月
	乙液	30ml×1 瓶	60ml×1 瓶	4℃保存 3 个月
试剂四底物应用液的配制: 按甲液:乙液=1:200的比例进行配制, 需多少配多少。配好后 37℃水浴预温 10 分钟以上。				
试剂五	甲液	4ml×1 瓶	4ml×2 瓶	4℃保存 3 个月
	乙液	4ml×1 瓶	4ml×1 瓶	4℃保存 3 个月
	丙液	30ml×1 瓶	30ml×2 瓶	4℃保存 3 个月
铜试剂配制: 按甲液:乙液:丙液=2:1:17 的比例进行配制, 配好的铜试剂为澄清液体, 需多少配多少(用不完的不可以和新配的铜试剂混合, 否则会对结果有影响。), 用之前 37℃ 水				

浴预温 10 分钟以上. 请严格按照甲、乙、丙顺序配制铜试剂, 每加完一样试剂请混匀。				
试剂六	氯仿 (分析纯) 自备			
试剂七	甲粉	甲粉×2 支	甲粉×3 支	4℃保存 3 个月
	乙液	10ml×2 瓶	10ml×3 瓶	4℃保存 3 个月
	丙液	0.5ml×1 支	0.5ml×1 支	4℃保存 3 个月
显色剂的配制: 用时将一支甲粉加一支乙液 10ml 充分溶解, 并且一定要在临用前 1~2 分钟按 100:1 的比例加入丙液, 混匀后立即使用, 用多少配多少*, 用不完的显色剂不可以再用。 甲乙混合液可以-20℃保存。				
试剂八	标准品	粉剂×3 支	粉剂×3 支	4℃保存 3 个月
	溶剂	60ml×1 瓶	60ml×1 瓶	4℃保存 3 个月
2mmol/L 棕榈酸标贮液的配制: 取标准品粉剂 1 支加溶剂溶解并定容至 10ml, 一定要充分混匀。				
500 μmol/L 棕榈酸标准品的配制: 取 2mmol/L 棕榈酸标贮液用溶剂 4 倍稀释, 即 2mmol/L 棕榈酸标准品: 溶剂=1:3 稀释。				

三、操作步骤:

1、样本的前处理:

①、称取组织的重量, 按重量 (g): 体积 (ml) =1: 9 的比例, 加入 9 倍体积的生理盐水, 冰水浴条件下机械匀浆, 制成 10%组织匀浆, 2500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液待测

②、血清 (浆) 样本直接取样进行测定。

2、操作表:

[注]: 吸取试剂六时必须采用玻璃移液管, 不可用移液枪进行操作

吸取下层抽提液时采用玻璃注射器及硬膜外麻醉针心针套 (本所有售), 不可用移液枪进行操作

	空白管	标准管	脂蛋白脂酶	肝脂酶
双蒸水 (ml)	0.2	0.15		

500 μ mol/L 标准应用液 (ml)		0.05		
血清(浆)或 10%匀浆上清液 (ml)			0.05	0.05
试剂一 (ml)			0.05	0.05
摇动试管架混匀				
试剂二 (ml)			0.1	
试剂三 (ml)				0.1
摇动试管架混匀				
试剂四底物应用液 (ml) (37 $^{\circ}$ C预温, 用玻璃移液管吸取)	0.5	0.5	0.5	0.5
漩涡混匀, 37 $^{\circ}$ C水浴 20 分钟				
试剂五铜试剂 (ml) (37 $^{\circ}$ C预温)	0.5	0.5	0.5	0.5
漩涡混匀 10 秒, 37 $^{\circ}$ C水浴 10 分钟				
试剂六抽提液 (ml) (37 $^{\circ}$ C预温, 用玻璃注射器吸取)	3.0	3.0	3.0	3.0
37 $^{\circ}$ C水浴 10 分钟, 漩涡混匀器充分混匀抽提至少 2 分钟以上。3500 转/分, 离心 10 分钟, 仔细吸去上层蓝色液体及蛋白凝块弃之[注 3], 吸取下层抽提液 1ml 进行显色。详细操作步骤至关重要请认真阅读详细说明书注解部分				
下层抽提液 (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0
试剂七 显色剂 (ml)	0.2	0.2	0.2	0.2

混匀, 静置 5 分钟, 550 nm 处, 0.5cm 光径, 试剂六调零[注 7], 将脂蛋白脂酶和肝脂酶管平行比色, 测各管吸光度。

四、计算与举例：

1、血清（浆）的计算与举例：

①、定义：每毫升每小时在反应系统中所产生的 1 微摩尔（ μmol ）的游离脂肪酸 FFA 为 1 个酶活性单位（ $\text{FFA}\mu\text{mol}/\text{ml}$ 血清（浆） \cdot 小时）

②、计算公式：

$$\text{脂蛋白脂酶活性 (U/ml)} = \frac{\text{脂蛋白脂酶管 OD 值} - \text{空白管 OD 值} \times \text{标准品浓度} \times \text{样本测试前} \times 60 \text{ 分钟}}{\text{标准管 OD 值} - \text{空白管 OD 值} \times (500 \mu\text{mol/L}) \times \text{稀释倍数} \times 20 \text{ 分钟}} \div 1000$$

$$\text{肝脂酶活性 (U/ml)} = \frac{\text{肝脂酶管 OD 值} - \text{空白管 OD 值} \times \text{标准品浓度} \times \text{样本测试前} \times 60 \text{ 分钟}}{\text{标准管 OD 值} - \text{空白管 OD 值} \times (500 \mu\text{mol/L}) \times \text{稀释倍数} \times 20 \text{ 分钟}} \div 1000$$

$$\text{总脂酶活性} = \text{脂蛋白脂酶活性} + \text{肝脂酶活性}$$

2、组织的计算与举例：

①、定义：

每毫克组织蛋白每小时在反应系统中所产生的 1 微摩尔（ μmol ）的游离脂肪酸 FFA 为 1 个酶活性单位（ $\text{FFA}\mu\text{mol}/\text{mgprot}\cdot$ 小时）

②、计算公式：

$$\text{脂蛋白脂酶活性 (U/mgprot)} = \frac{\text{脂蛋白脂酶管 OD 值} - \text{空白管 OD 值} \times \text{标准品浓度} \times \text{样本测试前} \times 60 \text{ 分钟}}{\text{标准管 OD 值} - \text{空白管 OD 值} \times (500 \mu\text{mol/L}) \times \text{稀释倍数} \times 20 \text{ 分钟}} \div \text{待测匀浆蛋}$$

$$\text{肝脂酶活性 (U/mgprot)} = \frac{\text{肝脂酶管 OD 值} - \text{空白管 OD 值} \times \text{标准品浓度} \times \text{样本测试前} \times 60 \text{ 分钟}}{\text{标准管 OD 值} - \text{空白管 OD 值} \times (500 \mu\text{mol/L}) \times \text{稀释倍数} \times 20 \text{ 分钟}} \div \text{待测匀浆蛋}$$

五、测试原理：

脂蛋白脂酶(LPL) 和肝脂酶(HL) 可分解甘油三酯(TG) 并水解为甘油及游离脂肪酸(FFA)，用铜试剂测定生成

的游离脂肪酸(FFA)的量即可分别计算脂蛋白脂酶(LPL)和肝脂酶(HL)的活性。

肝脂酶为糖蛋白，其活性不需要载脂蛋白(apolipoprotein)C II 激活及一些离子的激活，不受高浓度盐及鱼精蛋白的抑制，利用此特点即可分别计算脂蛋白脂酶(LPL)和肝脂酶(HL)的活性。