总脂酶[脂蛋白脂酶(LPL)、肝脂酶(HL)]测定试剂盒

比色法: 100 管/48 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 μ mol/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）·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（ $\text{FFA}\mu\text{mol}/\text{mgprot} \cdot \text{小时}$ ）

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。