

总脂酶测试盒说明书

(货号: A067-1 可同时测脂蛋白脂酶及肝脂酶)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书, 测试后再进行批量实验, 否则由此导致的后果用户自行承担!

一、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。

二、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 3 个月)

	组份	50 管/24 样 (货号 A067-1-1)	100 管/48 样 (货号 A067-1-2)	保存
试剂一	粉剂	粉剂×2支	粉剂×4支	4℃
	溶剂	5mL×1瓶	10mL×1瓶	4℃
试剂一应用液的配制: 用时每支粉剂加溶剂1.5mL溶解, 4℃保存。				
试剂二	促进剂	6mL×1瓶	6mL×2瓶	4℃
	抑制剂	6mL×1瓶	6mL×2瓶	4℃
试剂三	溶液	6mL×1瓶	6mL×2瓶	4℃
试剂四	甲液	0.5mL×1支	0.5mL×1支	4℃
	乙液	30mL×1瓶	60mL×1瓶	4℃
试剂四(底物液)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分钟以上再使用。				
试剂五	甲液	4mL×1瓶	4mL×2瓶	4℃
	乙液	4mL×1瓶	4mL×1瓶	4℃
	丙液	30mL×1瓶	30mL×2瓶	4℃
	试剂五(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	250mL(自备)	400mL(自备)	常温避光
试剂七	甲粉	甲粉×2支	甲粉×3支	4℃
	乙液	10mL×2瓶	10mL×3瓶	4℃
	丙液	0.5mL×1支	0.5mL×1支	4℃
	试剂七(显色剂)的配制: 用时将一支甲粉加到一瓶乙液中充分溶解, 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℃
	溶剂	60mL×1瓶	60mL×1瓶	4℃
	2mmol/L棕榈酸标准液的配制: 取标准品粉剂1支加10mL溶剂溶解, 一定要充分混匀直至完全溶解。 500μmol/L棕榈酸标准品的配制: 取2mmol/L棕榈酸标准液用溶剂4倍稀释, 即2mmol/L棕榈酸标准品:溶剂=1:3稀释。			

三、所需仪器及试剂:

可见分光光度计及 0.5cm 光径比色皿, 涡旋混匀器, 离心机, 玻璃注射器(1~2mL 规格)及硬膜外麻醉针

心针套(本公司有售), 37℃水浴锅或恒温箱, 氯仿(三氯甲烷, 分析纯), 蒸馏水, 玻璃移液管, 蛋白测定试剂(组织样本用, 本公司有售)。

四、操作步骤:

1、样本的前处理:

①、组织样本: 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, 3500~4000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: (吸取下层抽提液时最好采用玻璃注射器及硬膜外麻醉针心针套进行操作)

	空白管 (o)	标准管 (s)	脂蛋白脂酶管 (x)	肝脂酶管 (y)
蒸馏水(mL)	0.3	0.25	0.1	
500μmol/L标准液(mL)		0.05		
样本(mL)			0.05	0.05
试剂一应用液(mL)			0.05	0.05
混匀(小幅度摇动试管(架))				
试剂二促进剂(mL)				0.1
试剂二抑制剂(mL)			0.1	
试剂三(mL)				0.1
混匀(小幅度摇动试管(架))				
试剂四底物液(mL) (37℃预温)	0.5	0.5	0.5	0.5
漩涡混匀, 37℃水浴 20 分钟				
试剂五铜试剂(mL) (37℃预温)	0.5	0.5	0.5	0.5
漩涡混匀(10秒), 37℃水浴 10 分钟				
试剂六氯仿(mL)	3.0	3.0	3.0	3.0
37℃水浴 10 分钟后, 漩涡混匀至少 2 分钟, 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], 吸取最下层抽提液 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, 常温下避光静置 5 分钟, 分光光度计 550 nm 处, 0.5cm 光径, 试剂六调零, 将脂蛋白脂酶和肝脂酶管平行比色, 测各管吸光度(A)。				

注: 详细操作步骤: (操作过程最好是用玻璃试管, 其它试管或离心管之前先确定氯仿对其是否有腐蚀作用, 确定无反应后才能使用)

- 充分涡旋混匀(抽提) 2 分钟~5 分钟(用秒表计时)。在涡旋混匀前用塞子或薄膜将试管封口, 在混匀过程中注意观察试管中液体上下是否混均匀(一边混匀一边要观察反应液上下颜色是否均匀一致), 如果发现颜色上深下浅则需要将管子提起来再放下混匀, 使得在混匀过程中混匀液上下颜色一致。混匀 2 分钟后, 静置观察反应液是否分层, 如果立即分层且管底呈透明则需继续混匀达到不立即分层或管底为乳白色状为止(空白和标准管除外)。
- 吸取试剂六抽提液时必须用玻璃移液管进行操作。
- 混匀完后以 3500 转/分, 离心 10 分钟, 若发现下层液

体呈半凝固状态、凝固层较厚或下层液体不足 1mL

时，则可用小玻棒或硬膜外麻醉针心轻轻搅拌下层液体后再次离心，直至分层清楚。

- 4、用移液枪吸取上层液体及凝固层并弃之。
- 5、另取一个注射器及硬膜外麻醉针心针套（不可以用注 2、注 3 中的注射器及针心针套），在每吸取一个测定管前先用无水乙醇涮洗 2~3 次，再用试剂六抽提液涮洗 2~3 次。然后将硬膜外麻醉针心插入针套中，小心插入下层抽提液中，拔出针心，接上注射器吸取下层抽提液 1.3~1.5mL 至另一试管中。（这样可避免上层液体及凝固层混入下层液体中，否则会影响结果。）若偶然发现抽提液有雾状混浊，可放入 37℃ 水浴 1~2 分钟，雾状混浊即可消失。
- 6、再从上述试管中用移液器准确吸取 1mL 下层抽提液加入另一试管中，加显色剂进行显色。
- 7、先用无水乙醇将比色皿洗干净后，再将试剂六倒入比色皿中进行调零（注意通风），将脂蛋白酯酶管（x）和肝酯酶管（y）平行比色，分光光度计测各管吸光度（A）。

以上七点为实验成败的关键。

六、检测范围：

0.04-32.4U/mL。

七、测定意义：

脂蛋白酯酶(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。

肝酯酶（Hepatic Lipase HL）则仅存在肝内皮细胞表面，它主要在低密度脂蛋白（LDL）和高密度脂蛋白（HDL）代谢中起重要作用。

五、计算：

1、血清（浆）的计算：

- ①、定义：每毫升血清（浆）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（ $\mu\text{molFFA}/\text{mL}$ 血清（浆）/小时）。

②、计算公式：

$$\text{脂蛋白酯酶活性 (U/mL)} = \frac{A_x - A_o}{A_s - A_o} \times C_{\text{标准}} \times N \times \frac{60}{T} \div 1000$$

$$\text{肝酯酶活性 (U/mL)} = \frac{A_y - A_o}{A_s - A_o} \times C_{\text{标准}} \times N \times \frac{60}{T} \div 1000$$

总脂酶活性=脂蛋白酯酶活性+肝酯酶活性

C_{标准}：标准液浓度，500 $\mu\text{mol/L}$ ；

N：样本测试前稀释倍数；

T：反应时间，20min。

2、组织的计算：

- 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（ $\mu\text{molFFA}/\text{mgprot}$ /小时）

②、计算公式：

$$\text{脂蛋白酯酶活性 (U/mg 蛋白)} = \frac{A_x - A_o}{A_s - A_o} \times C_{\text{标准}} \times N \times \frac{60}{T} \div 1000 \div \text{Cpr}$$

$$\text{肝酯酶活性 (U/mg 蛋白)} = \frac{A_y - A_o}{A_s - A_o} \times C_{\text{标准}} \times N \times \frac{60}{T} \div 1000 \div \text{Cpr}$$

总脂酶活性=脂蛋白酯酶活性+肝酯酶活性

C_{标准}：标准液浓度，500 $\mu\text{mol/L}$ ；

N：样本测试前稀释倍数；

T：反应时间，20min。

Cpr：组织样本蛋白浓度，mg/mL。