

肝脂酶（HL）活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号：AC10432

规格：50T/24S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 100 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	液体 3 mL×1 瓶	4°C保存
试剂三	粉剂×1 瓶	4°C保存
试剂四	粉剂×2 瓶	-20°C保存
标准品	粉剂×1 瓶	4°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂三：临用前加入 30 mL 双蒸水，充分溶解待用，用不完的 4°C保存两周；
- 2、试剂四：临用前取 1 瓶加入 2 mL 双蒸水，充分溶解，用不完的试剂可-20°C分装保存一周，避免反复冻融
- 3、标准品：临用前加入 6.94 mL 丙酮，配成 10 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ α -萘酚标准溶液，充分溶解待用，用不完的-20°C保存两周。

产品说明：

肝脂酶（hepaticlipase, HL）是一种脂肪分解酶，在肝实质细胞中合成，存在于肝脏窦周间隙内皮细胞表面和窦周间隙腔面的肝细胞微绒毛表面，可水解各种脂蛋白中的甘油三酯（TG）和磷脂（PL），使各种脂蛋白颗粒的大小和密度发生变化，当血浆中的 HL 及其活性增高时，可导致血浆中低密度脂蛋白（LDL）水平升高，加速动脉粥样硬化的发生与发展。

肝脂酶水解 α -乙酸萘酯产生 α -萘酚，可与固蓝 B 盐形成紫红色偶氮化合物，在 595 nm 有特征吸收峰，其颜色深浅在一定范围内与肝脂酶活性成正相关。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、天平、低温离心机、水浴锅、1 mL 玻璃比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器、漩涡振荡仪、EP 管、丙酮、蒸馏水。

操作步骤：**一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）**

1、组织：按照质量（g）：试剂一体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取样本约 0.1g，加入 1mL 试剂一），加入试剂一，冰浴匀浆后于 4°C，10000 \times g 离心 10 min，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 1 mL 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 3 min）；然后于 4°C，10000 \times g 离心 10 min，取上清待测。

3、血清/血浆：直接检测。

二、测定步骤

1、分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 595 nm，用蒸馏水调零。

2、将试剂三在 30°C 预热 20 min 以上。

3、将 10 μmol/mL 的标准溶液用试剂一稀释为 1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078 μmol/mL 的标准溶液备用。

4、操作表：(在 1.5 mL 离心管中依次加入下列试剂)

试剂名称	对照管	测定管	标准管	空白管
样品 (μL)	100	100	-	-
标准溶液 (μL)	-	-	100	-
试剂一 (μL)	450	400	400	500
试剂二 (μL)	-	50	50	50
混匀, 30°C 反应 10 min			-	-
试剂三 (μL)	400	400	400	400
试剂四 (μL)	50	50	50	50

充分混匀，测定 595 nm 处吸光值，分别记为 A 对照管、A 测定管、A 标准管和 A 空白管。计算 $\Delta A = A$ 测定管 - A 对照管， ΔA 标准 = A 标准管 - A 空白管。(每个测定管需设一个对照管，空白管和标准管需做 1-2 次)

三、HL 酶活计算

1、标准曲线的绘制：

以各个标准溶液的浓度为 x 轴，其对应的 ΔA 标准为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y = kx + b$ ，将 ΔA 带入方程得到 x (μmol/mL)。

2、HL 酶活的计算：

(1) 按蛋白浓度计算

酶活定义：每毫克蛋白每分钟水解 α-乙酸萘酯产生 1 μmol 的 α-萘酚为一个酶活力单位。

HL 活性 (U/mg prot) = $x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 0.1x \div C_{\text{pr}}$

(2) 按样本质量计算

酶活定义：每克组织每分钟水解 α-乙酸萘酯产生 1 μmol 的 α-萘酚为一个酶活力单位。

HL 活性 (U/g 质量) = $x \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.1x \div W$

(3) 按照细胞数量计算

酶活定义：每 10⁴ 个细胞每分钟水解 α-乙酸萘酯产生 1 μmol 的 α-萘酚为一个酶活力单位。

HL 活性 (U/10⁴ cell) = $x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量 (万个)} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.1x \div \text{细胞数量 (万个)}$

(4) 按液体体积计算

酶活定义：每毫升血清/血浆每分钟水解 α-乙酸萘酯产生 1 μmol 的 α-萘酚为一个酶活力单位。

HL 活性 (U/mL) = $x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T = 0.1x$

V 样：反应体系中加入样本体积，0.1 mL；C_{pr}：样本蛋白浓度，mg/mL，蛋白浓度自行测定；W：样本质量，g；V 样总：加入试剂一体积，1 mL；T：反应时间，10 min。

注意事项：

1、若样本为动物肝脏，建议将样本用试剂一稀释 25 倍以上再进行检测，并在计算公式中乘以稀释倍数。

2、若样本为肥胖型动物血清或血浆，建议将样本用试剂一稀释 5 倍以上再进行检测，并在计算公式中乘以稀释倍数。

3、当 ΔA 大于 0.8 时，建议将样本用试剂一稀释后再进行测定，并在计算公式中乘以稀释倍数。

实验实例：

1、取 0.1g 大鼠肝脏，进行样本处理，取上清稀释 48 倍后按照操作步骤进行操作，测得计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.713 - 0.001 = 0.712$ ，带入标准曲线 $y = 0.6381x - 0.0005$ ，计算 $x = 1.1166$ ，按照样本质量计算酶活得：

HL 活性 (U/g 质量) $= x \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 48 = 53.597 \text{ U/g 质量}$ 。

2、取火鸡血清稀释 12 倍后按照操作步骤进行操作，测得计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.572 - 0.003 = 0.569$ ，带入标准曲线 $y = 0.6381x - 0.0005$ ，计算 $x = 0.892$ ，按照液体体积计算酶活得：

HL 活性 (U/mL) $= x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T \times 12 = 1.071 \text{ U/mL}$ 。