

脂蛋白酯酶（LPL）活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号：AC10439

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 60 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×1 支	4°C保存
试剂三	液体 30 mL×1 瓶	4°C保存
标准品	液体 1 mL×1 支	4°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 1.5 mL 丙酮溶解备用；
- 2、标准品：5 $\mu\text{mol/mL}$ 对硝基苯酚标准溶液。

产品说明：

脂蛋白酯酶（Lipoproteinlipase, LPL）是甘油三酯降解的降速酶，可催化甘油三酯水解为脂肪酸和单酸甘油酯，主要在肝脏实质细胞中合成，在脂质代谢和转运中发挥重要作用。

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。

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、低温台式离心机、水浴锅、1mL玻璃比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器、EP管、冰、丙酮和蒸馏水。

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、细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：试剂一体积（mL）为 500~1000: 1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；10000g 4°C离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、组织：按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为 1: 5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一），进行冰浴匀浆。10000g 4°C离心 10min，取上清，置冰上待测。

3、血清（浆）样本：直接检测。

二、测定步骤

1、分光光度计预热30min以上，调节波长至400nm，蒸馏水调零。

2、将5 $\mu\text{mol/mL}$ 标准液用试剂一稀释16倍至0.3125 $\mu\text{mol/mL}$ 的标准溶液备用。

3、操作表：在1.5mL EP管中进行下列操作：

样本名称	对照管	测定管	标准管	空白管
样本 (μL)	100	100	-	
标准管 (μL)	-	-	100	
蒸馏水 (μL)	-	-	-	100
试剂一 (μL)	400	360	400	400
试剂二 (μL)	-	40	-	-
混匀, 45°C水浴10min			-	-
试剂三 (μL)	500	500	500	500
充分混匀放置 2min 后, 对照管和测定管 8000g 常温离心 10min, 取上清、标准管和空白管于 1mL 玻璃比色皿中测定 400nm 处吸光值, 记为 A 对照管、A 测定管、A 空白管、A 标准管, $\Delta A = A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}$, $\Delta A \text{ 标准} = A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}$ 。				

三、LPL活性计算

1、血清（浆）LPL活力计算

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

$$\text{LPL (U/mL)} = \Delta A \div (\Delta A \text{标准} \div C \text{标准}) \div T \times 1000 = 31.25 \times \Delta A \div \Delta A \text{标准}$$

2、组织、细菌或细胞中LPL活力计算

(1) 按样本质量计算

单位定义：在45°C，pH7.5条件下，每克组织每分钟水解产生1nmol 4-硝基苯酚为一个酶活力单位。

$$\text{LPL (U/g 质量)} = \Delta A \div (\Delta A \text{标准} \div C \text{标准}) \times V \text{提取} \div W \div T \times 1000 = 31.25 \times \Delta A \div \Delta A \text{标准} \div W$$

(2) 按样本蛋白浓度计算

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

$$\text{LPL (U/mg prot)} = \Delta A \div (\Delta A \text{标准} \div C \text{标准}) \times V \text{提取} \div (V \text{提取} \times C \text{pr}) \div T \times 1000 = 31.25 \times \Delta A \div \Delta A \text{标准} \div C \text{pr}$$

(3) 按细菌或细胞数量计算：

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

$$\text{LPL (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div (\Delta A \text{标准} \div C \text{标准}) \times V \text{提取} \div 500 \div T \times 1000 = 0.0625 \times \Delta A \div \Delta A \text{标准}$$

C标准：标准溶液浓度，0.3125μmol/mL；V提取：加入试剂一体积，1mL；T：反应时间，10min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500万；1000：单位换算系数，1μmol=1000nmol。

注意事项：

- 1、测定管加入试剂二后混变浑浊为正常现象。
- 2、若A大于1，将粗酶液用试剂一稀释后再进行测定。

实验实例：

- 1、取0.1g大鼠肌肉加入1mL试剂一，取上清后按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A = A \text{测定管} - A \text{对照管} = 0.697 - 0.160 = 0.537$ ， $\Delta A \text{标准} = A \text{标准管} - A \text{空白管} = 0.545 - 0.001 = 0.544$ ，按样本质量计算酶活得：

$$\text{LPL (U/g 质量)} = 31.25 \times \Delta A \div \Delta A \text{标准} \div W = 31.25 \times 0.537 \div 0.544 \div 0.1 = 308.48 \text{ U/g 质量}$$

- 2、取兔血清稀释2倍后按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A = A \text{测定管} - A \text{对照管} = 0.639 - 0.096 = 0.543$ ， $\Delta A \text{标准} = A \text{标准管} - A \text{空白管} = 0.545 - 0.001 = 0.544$ ，按血清（浆）体积计算酶活得：

$$\text{LPL (U/mL)} = 31.25 \times \Delta A \div \Delta A \text{标准} \times 2 (\text{稀释倍数}) = 31.25 \times 0.543 \div 0.544 \times 2 (\text{稀释倍数}) = 62.39 \text{ U/mL}$$