

脂蛋白酯酶（Lipoprotein lipase, LPL）试剂盒说明书

微量法100T/48S

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

测定意义

脂蛋白酯酶是脂肪细胞、心肌细胞、骨骼肌细胞、乳腺细胞及巨噬细胞等实质细胞合成的一种酶，可催化甘油三酯水解为脂肪酸和单酸甘油酯，以供组织氧化供能和贮存，并在不同的组织表现出不同的生理意义。

测定原理

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。

自备实验用品及仪器

天平、冷冻离心机、研钵、水浴锅、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板。

试剂组成和配制

试剂一：液体105mL×1瓶，4°C保存。

试剂二：液体4mL×1瓶，4°C避光保存。

试剂三：液体10mL×1瓶，4°C保存。

样品处理

1. 组织：按照质量（g）：试剂一体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g，加入1mL试剂一）加入试剂一，冰浴匀浆后于4°C，10000g离心10min，取上清待测。
2. 细胞：按照细胞数量（10⁴个）：试剂一体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细胞加入1mL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3min）；然后于4°C，10000g离心10min，取上清待测。
3. 血清：直接测定。

测定操作

	对照管	测定管
样品（ μL ）	20	20
试剂一（ μL ）	80	
试剂二（ μL ）		80
混匀，45°C水浴10min		
试剂三（ μL ）	100	100
充分混匀，25°C静置2min，于微量石英比色皿/96孔板，测定400nm处吸光值，记为A对照管和A测定管， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$		

计算公式

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线: $y = 0.0581x - 0.0169$, $R^2 = 0.9982$

1. 按照蛋白浓度计算

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

$$\begin{aligned} \text{LPL活性 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A + 0.0169) \div 0.0581 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 17.21 \times (\Delta A + 0.0169) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

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

$$\begin{aligned} \text{LPL活性 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.0169) \div 0.0581 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 17.21 \times (\Delta A + 0.0169) \div W \end{aligned}$$

3. 按照细胞数量计算

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

$$\begin{aligned} \text{LPL活性 } (\mu\text{mol}/\text{min}/104 \text{ cell}) &= (\Delta A + 0.0169) \div 0.0581 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 17.21 \times (\Delta A + 0.0169) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

4. 按照液体体积计算

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

$$\begin{aligned} \text{LPL活性 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) &= (\Delta A + 0.0169) \div 0.0581 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 17.21 \times (\Delta A + 0.0169) \end{aligned}$$

V反总: 反应总体积, 0.2mL; V样: 反应体系中加入样本体积, 0.02mL; W: 样本质量, g; V样总: 加入提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 10min

b. 用96孔板测定的计算公式如下

标准曲线: $y = 0.029x - 0.0169$, $R^2 = 0.9982$

1. 按照蛋白浓度计算

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

$$\begin{aligned} \text{LPL活性 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A + 0.0169) \div 0.029 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 34.42 \times (\Delta A + 0.0169) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

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

$$\begin{aligned} \text{LPL活性 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.0169) \div 0.029 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 34.42 \times (\Delta A + 0.0169) \div W \end{aligned}$$

3. 按照细胞数量计算

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

$$\text{LPL活性 } (\mu\text{mol}/\text{min}/104 \text{ cell}) = (\Delta A + 0.0169) \div 0.029 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$=34.42 \times (\Delta A + 0.0169) \div \text{细胞数量}$$

4. 按照液体体积计算

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

$$\text{LPL活性} (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = (\Delta A + 0.0169) \div 0.029 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T$$

$$= 34.42 \times (\Delta A + 0.0169)$$

V反总：反应总体积，0.2mL；V样：反应体系中加入样本体积，0.02mL；W：样本质量，g；V样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，10min

注意事项

1. 试剂三加入混匀后静置两分钟立即测定，否则影响吸光值。
2. 吸光值过高或者测定结果不稳定，则将酶液进行适当的稀释，并在计算公式中乘以稀释倍数。