

总脂酶[脂蛋白脂酶(LPL)&肝脂酶(HL)]检测试剂盒(微量法)

货号: PMK1886

保存: 4℃避光保存 12 个月

规格: 48T/96T

适用样本: 血清(浆)、组织、细胞

产品简介

脂蛋白酯酶(Lipoproteinlipase, LPL)存在于全身毛细血管内皮细胞表面,是一种糖蛋白,主要由脂肪组织、心肌、骨骼肌、乳腺细胞、肾和巨噬细胞合成和分泌。LPL 催化血浆中乳糜微粒(CM)和极低密度脂蛋白(VLDL)中甘油三酯(TG)的水解,在CM及VLDL的降解中发挥重要作用。肝脂酶(hepaticlipase, HL)仅存在于肝内皮细胞表面,在中密度脂蛋白(IDL)和高密度脂蛋白(HDL)代谢中起重要作用。LPL 和HL活性降低,可引起高甘油三酯血症。在高脂血症、动脉粥样硬化的发病机理及脂蛋白代谢研究中,常常需要测定LPL及HL活性。本试剂盒可检测生物体内LPL和HL活性,其原理是脂蛋白脂酶(LPL)和肝脂酶(HL)均能分解甘油三酯(TG)并水解为甘油及游离脂肪酸(FFA),进一步通过铜试剂法测定体系中游离脂肪酸的生成即可计算总脂酶[脂蛋白脂酶(LPL)&肝脂酶(HL)]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,在反应体系中加入高浓度盐类即可测定肝脂酶(HL)的活性。

产品内容

| 试剂盒组分 | 规格 | | 储存条件 |
|----------|-------|---------|--------|
| | 48T | 96T | |
| 试剂一 | 25mL | 50mL | 4℃保存 |
| 试剂二 | 7.5mL | 15mL | 4℃避光保存 |
| 试剂三 | 自备 | 自备 | 室温保存 |
| 试剂四 | 5.4mL | 10.75mL | 4℃避光保存 |
| 试剂五 | 15mL | 30mL | 4℃避光保存 |
| 标准品(棕榈酸) | 粉剂×1瓶 | 粉剂×1瓶 | 4℃避光保存 |

自备耗材

酶标仪或可见分光光度计(能测550nm处的吸光度)
 96孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头
 恒温箱、制冰机、低温离心机
 玻璃瓶(用于配制试剂三)
 匀浆器(如果是组织样本)
 正庚烷、无水甲醇、氯仿(三氯甲烷)、无水乙醇、生理盐水、去离子水

试剂准备

试剂一: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4℃保存。
 试剂二: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4℃避光保存。
 试剂三: 自备。实验前1天, 在20mL玻璃瓶中加入9.6mL正庚烷, 0.4mL无水甲醇, 10mL氯仿(三氯甲烷), 盖紧后混匀, 室温保存。
 试剂四: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4℃避光保存。
 试剂五: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4℃避光保存。

产品说明书

标准品：粉剂×1瓶，室温保存。临用前向试剂瓶中加入 7.8mL 氯仿充分溶解，即为 500 μmol/L 的棕榈酸标准溶液。

样本制备

组织：称取 0.1g 样本，加入 1mL 生理盐水，冰浴匀浆，8,000g，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

细胞：收集 500 万细胞到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，离心后弃上清，加入 1mL 生理盐水，冰浴超声波破碎 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），然后 8,000g，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

血清（浆）等液体样本：直接测定。

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用 BCA 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 550nm，可见分光光度计去离子水调零。
2. 样本测定（在 EP 管中依次加入下列试剂）：

| 试剂（μL） | 标准管 | 空白管 | 总脂酶测定管 | 肝脂酶测定管 |
|--------|-----|-----|--------|--------|
| 样本 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| 去离子水 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 试剂一 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| 试剂二 | 0 | 0 | 100 | 100 |

盖紧后混匀；37℃水浴准确保温 60min；吸取 40 μL 上述溶液，加入另一个 EP 管

| | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|
| 试剂三 | 200 | 200 | 200 | 200 |
| 标准品 | 40 | 0 | 0 | 0 |
| 去离子水 | 0 | 40 | 0 | 0 |
| 样本 | 0 | 0 | 40 | 40 |

混匀后盖紧瓶盖，置于涡旋混合器上中速涡旋 30s

| | | | | |
|-----|----|----|----|----|
| 试剂四 | 80 | 80 | 80 | 80 |
|-----|----|----|----|----|

混匀后盖紧瓶盖，置于涡旋混合器上中速涡旋 30s，室温（25℃）放置 20min；2,000g，室温（25℃）离心 5 min，取清液 50μL 到新的 EP 管中（注意不要吸到蓝绿色悬浊部分）

| | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|
| 清液 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| 试剂五 | 200 | 200 | 200 | 200 |

室温（25℃）放置 5min。每管取出 200 μL 加入 96 孔板或微量玻璃比色皿中，于 550nm 测定吸光值，计算 $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ ， $\Delta A_{\text{总脂酶}} = A_{\text{总脂酶}} - A_{\text{空白}}$ ， $\Delta A_{\text{肝脂酶}} = A_{\text{肝脂酶}} - A_{\text{空白}}$ 。空白和标准只要做一次即可。显色后务必在 30min 内测完。

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 $\Delta A_{\text{总脂酶}}$ 或 $\Delta A_{\text{肝脂酶}}$ 小于 0.005 可适当加大样本量。如果 $\Delta A_{\text{总脂酶}}$ 或 $\Delta A_{\text{肝脂酶}}$ 大于 2，样本可用生理盐水适当稀释，计算结果乘以稀释倍数。

结果计算

1. 按样本质量计算

酶活性单位定义：每 g 组织在反应体系中每小时催化产生 1 μmol FFA 定义为一个酶活性单位 U。

总脂酶 (U/g 鲜重) = $C_{\text{标}} \times (\Delta A_{\text{总脂酶}} \div \Delta A_{\text{标}}) \times V_{\text{反应}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.625 \times (\Delta A_{\text{总脂酶}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div W$

肝脂酶 (U/g 鲜重) = $C_{\text{标}} \times (\Delta A_{\text{肝脂酶}} \div \Delta A_{\text{标}}) \times V_{\text{反应}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.625 \times (\Delta A_{\text{肝脂酶}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div W$

脂蛋白脂酶 (U/g 鲜重) = 总脂酶活性 - 肝脂酶活性

2. 按液体样本体积计算

酶活性单位定义：每 mL 液体样本在反应体系中每小时催化产生 1 μmol FFA 定义为一个酶活性单位 U。

总脂酶 (U/mL) = $C_{\text{标}} \times (\Delta A_{\text{总脂酶}} \div \Delta A_{\text{标}}) \times V_{\text{反应}} \div V_{\text{样}} \div T = 2.625 \times (\Delta A_{\text{总脂酶}} \div \Delta A_{\text{标}})$

产品说明书

肝脂酶 (U/mL) = $C_{\text{标}} \times (\Delta A_{\text{肝脂酶}} \div \Delta A_{\text{标}}) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 2.625 \times (\Delta A_{\text{肝脂酶}} \div \Delta A_{\text{标}})$

脂蛋白脂酶 (U/mL) = 总脂酶活性 - 肝脂酶活性

3. 按细胞数量计算

酶活性单位定义：每 1 万个细胞样本在反应体系中每小时催化产生 1 μmol FFA 定义为一个酶活性单位 U。

总脂酶 (U/ 10^4 cell) = $C_{\text{标}} \times (\Delta A_{\text{总脂酶}} \div \Delta A_{\text{标}}) \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.005 \times (\Delta A_{\text{总脂酶}} \div \Delta A_{\text{标}})$

肝脂酶 (U/ 10^4 cell) = $C_{\text{标}} \times (\Delta A_{\text{肝脂酶}} \div \Delta A_{\text{标}}) \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.005 \times (\Delta A_{\text{肝脂酶}} \div \Delta A_{\text{标}})$

脂蛋白脂酶 (U/ 10^4 cell) = 总脂酶活性 - 肝脂酶活性

4. 按蛋白浓度计算

酶活性单位定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每小时催化产生 1 μmol FFA 定义为一个酶活性单位 U。

总脂酶 (U/mg prot) = $C_{\text{标}} \times (\Delta A_{\text{总脂酶}} \div \Delta A_{\text{标}}) \times V_{\text{反总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 2.625 \times (\Delta A_{\text{总脂酶}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div C_{\text{pr}}$

肝脂酶 (U/mg prot) = $C_{\text{标}} \times (\Delta A_{\text{肝脂酶}} \div \Delta A_{\text{标}}) \times V_{\text{反总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 2.625 \times (\Delta A_{\text{肝脂酶}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div C_{\text{pr}}$

脂蛋白脂酶 (U/mg prot) = 总脂酶活性 - 肝脂酶活性

$C_{\text{标}}$: 标准品浓度, 500 $\mu\text{mol/L} = 0.5 \mu\text{mol/mL}$; $V_{\text{反总}}$: 催化反应体系总体积, 210 $\mu\text{L} = 0.21\text{mL}$; $V_{\text{样}}$: 加入催化反应体系中粗酶液体积, 10 $\mu\text{L} = 0.01\text{mL}$; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1mL; 样本鲜重, g; 500: 细胞总数, 500 万; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL; T: 催化反应时间, 60min, 1h。

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

PMK1141 肝脂酶 (HL) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1142 甘油三酯 (TG) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1137 游离脂肪酸 (FFA) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1019 脂肪酸合成酶 (FAS) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1138 脂肪酶 (LPS) 检测试剂盒 (微量法)

更多产品详情了解，请关注公众号：

