

肝酯酶（Hepatic lipase, HL）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：

肝酯酶是脂肪分解酶，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，可促进脂蛋白中的胆固醇向类固醇激素转化，血浆中的 HL 活性增高时，血浆中小颗粒可导致 LDL 水平升高，加速动脉粥样硬化的发生。

测定原理：

肝酯酶水解 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 595nm 有特征吸收峰，颜色深浅在一定范围内与肝酯酶活性成正相关。

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 110mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 1mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂三：液体 8mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂四：液体 1mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

样品处理：

1. 组织：按照质量（g）：试剂一（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℃，10000g 离心 10min，取上清待测。
2. 细胞：按照细胞数量（ 10^4 个）：试剂一（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℃，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（ μ L）	20	20
试剂一（ μ L）	90	80
试剂二（ μ L）		10
混匀，30℃ 水浴 10min		
试剂三（ μ L）	80	80
试剂四（ μ L）	10	10
充分混匀，30℃ 静置 5min，于微量石英比色皿/96 孔板，测定 595nm 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: $y = 0.1519x - 0.1241$, $R^2 = 0.9994$

1. 按照蛋白浓度计算

酶活性定义: 每毫克蛋白每分钟水解 α -乙酸萘酯产生 $1\mu\text{mol}$ α -萘酚为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{HL 活性 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A + 0.1241) \div 0.1519 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 6.58 \times (\Delta A + 0.1241) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

酶活性定义: 每克组织每分钟水解 α -乙酸萘酯产生 $1\mu\text{mol}$ α -萘酚为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{HL 活性 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.1241) \div 0.1519 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 6.58 \times (\Delta A + 0.1241) \div W \end{aligned}$$

3. 按照细胞数量计算

酶活性定义: 每 10^4 个细胞每分钟水解 α -乙酸萘酯产生 $1\mu\text{mol}$ α -萘酚为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{HL 活性 } (\mu\text{mol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A + 0.1241) \div 0.1519 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 6.58 \times (\Delta A + 0.1241) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

4. 按照液体体积计算

酶活性定义: 每毫升血清每分钟水解 α -乙酸萘酯产生 $1\mu\text{mol}$ α -萘酚为一个酶活力单位。HL 活性 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$) =

$$\begin{aligned} &(\Delta A + 0.1241) \div 0.1519 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 6.58 \times (\Delta A + 0.1241) \end{aligned}$$

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: $y = 0.076x - 0.1241$, $R^2 = 0.9994$

1. 按照蛋白浓度计算

酶活性定义: 每毫克蛋白每分钟水解 α -乙酸萘酯产生 $1\mu\text{mol}$ α -萘酚为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{HL 活性 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A + 0.1241) \div 0.076 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 13.16 \times (\Delta A + 0.1241) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

酶活性定义: 每克组织每分钟水解 α -乙酸萘酯产生 $1\mu\text{mol}$ α -萘酚为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{HL 活性 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.1241) \div 0.076 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 13.16 \times (\Delta A + 0.1241) \div W \end{aligned}$$

3. 按照细胞数量计算

酶活性定义: 每 10^4 个细胞每分钟水解 α -乙酸萘酯产生 $1\mu\text{mol}$ α -萘酚为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{HL 活性 } (\mu\text{mol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A + 0.1241) \div 0.076 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 13.16 \times (\Delta A + 0.1241) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

4. 按照液体体积计算

酶活性定义: 每毫升血清每分钟水解 α -乙酸萘酯产生 $1\mu\text{mol}$ α -萘酚为一个酶活力单位。HL 活性 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$) =

$$\begin{aligned} &(\Delta A + 0.1241) \div 0.076 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 13.16 \times (\Delta A + 0.1241) \end{aligned}$$

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