

脂肪酶（LPS）活性检测试剂盒说明书

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。

规格：100T/96S

微量法

产品内容：

试剂一：液体 120mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 6mL×1 瓶，室温保存。

试剂三：液体 10mL×1 瓶，4℃ 保存。

标准品：59.3μL×1 支，4℃ 保存。临用前加入 1.5 mL 无水乙醇配成 125 μmol/mL 的油酸标准溶液，充分溶解。用前注意解冻溶解。

产品说明：

LPS 又称甘油酯水解酶，催化甘油三酯水解生成脂肪酸和甘油（或者甘油二酯和单酯）。LPS 广泛的存在于各种生物中。血清中 LPS 的异常增高常见于胰腺炎和胰腺癌。

LPS 催化油酯水解成脂肪酸，利用铜皂法测定脂肪酸生成速率，即可计算 LPS 活性。

试验中所需的仪器和试剂：

研钵、台式离心机、震荡混匀器、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/酶标板（非聚苯乙烯材质）、可调式移液枪、甲苯、无水乙醇、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、粗酶液提取：

组织样品：称取约 0.1g 样品，加试剂一 1.0 mL 充分研磨，于 4℃，15000rpm 离心 30min，取上清液待测。

血清样品：直接检测。

二、测定步骤：

1、可见分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 710nm，甲苯调零。

2、试剂一和试剂二置于 37℃ 水浴预热 30min 以上。

3、标准溶液的稀释：将 125 μmol/mL 的油酸标准溶液用乙醇稀释为 125、62.5、31.25、15.625、7.8125、3.9 μmol/mL 的标准溶液待测。

4、操作表：

加入试剂（mL）	空白管	测定管	标准管
试剂一	0.15	0.15	0.15
试剂二	0.05	0.05	0.05
反复震荡混匀			
蒸馏水	0.08		

上清液/血清		0.08	
标准溶液			0.08
迅速震荡混匀后置于 37℃水浴准确反应 10 min			
甲苯	0.4	0.4	0.4
反复震荡混匀后，室温 4000rpm 离心 10 min			

取出离心管，小心吸取上层溶液 0.3 mL，加入另一 2 mL 塑料离心管中，按下表操作：

加入试剂 (mL)	空白管	测定管	标准管
试剂三	0.075	0.075	0.075

反复震荡混匀；室温 4000rpm 离心 10 min，小心吸取上层溶液 0.2mL，加入微量玻璃比色皿/酶标板中，于 710nm 处测定吸光值。记为 A 空白管，A 测定管，A 标准管，计算 ΔA 测定 = A 测定管 - A 空白管， ΔA 标准 = A 标准管 - A 空白管

三、LPS 活性计算：

1、标准曲线的绘制：以油酸标准溶液浓度为横坐标， ΔA 标准为纵坐标，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ 。将 ΔA 测定带入方程，得到 x ($\mu\text{mol/mL}$)

2、酶活计算：

(1) 按蛋白浓度计算：

活性单位定义：37℃中每毫克蛋白每分钟水解橄榄油生成 $1\mu\text{mol}$ 脂肪酸为一个酶活单位。

$$\text{LPS (U/mg prot)} = x \times V \text{ 样} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T = 0.1 \times x \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算：

活性单位定义：37℃中每克组织每分钟水解橄榄油生成 $1\mu\text{mol}$ 脂肪酸为一个酶活单位。

$$\text{LPS (U/g 鲜重)} = x \times V \text{ 样} \div (\text{W} \times V \text{ 样} \div V \text{ 提}) \div T = 0.1 \times x \div \text{W}$$

(3) 按血清计算：

活性单位定义：37℃中每 mL 血清每分钟水解橄榄油生成 $1\mu\text{mol}$ 脂肪酸为一个酶活单位。

$$\text{LPS (U/mL 血清)} = x \div T = 0.1 \times x。$$

V 样：加入反应体系中上清液体积，0.08 mL；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL，需要另外测定，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒；T：催化反应时间，10 min。W：样本鲜重，g；V 提：提取液体积，1mL。

注意事项：

- 1、甲苯有毒，实验过程中需佩戴手套和口罩。
- 2、实验过程中须远离火源。
- 3、当吸光度大于 1 时，建议将样本稀释后测量。
- 4、如果用酶标板进行试验，建议选用非聚苯乙烯材质的 96 孔板。