

脂肪酶（LPS）活性试剂盒说明书

微量法 100T/96S

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：

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。

测定原理：

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

自备仪器和用品：

研钵、台式离心机、震荡混匀器、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、可调式移液枪、甲苯 80mL、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 65mL×2 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 10mL×1 瓶，4℃ 保存。每次使用前用震荡混匀器剧烈震荡 20min。

试剂三：甲苯 80mL×1 瓶，4℃ 保存（自备）。

试剂四：液体 10mL×1 瓶，4℃ 保存。

标准品：液体 10 μL×1 瓶，10 μmol/mL 的标准溶液，4℃ 保存。临用前加入 3.168 mL 甲苯，充分溶解。

粗酶液提取：

1. 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。12000g，4℃ 离心 10min，取上清置冰上待测。
2. 细菌、真菌：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），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 12000g，4℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。
3. 血清等液体：直接检测。

LPS 测定操作：

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min，调节波长到 710 nm，蒸馏水调零。
2. 试剂一和试剂二置于 37℃ 水浴预热 30min。
3. 在 1.5mL EP 管中依次加入下列试剂

试剂名称（μL）	空白管	测定管
蒸馏水	150	
样本		50
试剂一	300	300
试剂二		100

37°C振荡反应 10 min

试剂三	800	800
-----	-----	-----

37°C振荡反应 10 min 后, 8000g, 25°C, 离心 10min, 取上清液

试剂名称 (μL)	空白管	测定管	标准管
上清液	400	400	
标准品			400
试剂四	100	100	100

37°C振荡反应 5 min 后, 静置 5min, 取 200μL 上层液加入微量石英比色皿/96 孔板, 于 710nm 处测定吸光值。

注意: 空白管和标准管只需测定一次。

LPS 活性计算公式:

1. 组织、细菌或细胞 LPS 活性

(1) 按照蛋白浓度计算

活性单位定义: 37°C 中每毫克蛋白每分钟水解橄榄油生成 1μmol 脂肪酸为一个酶活单位。

$$\text{LPS } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\text{C 标准品} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白管})] \times \text{V 反总} \div (\text{Cpr} \times \text{V 样}) \div \text{T} \\ = 16 \times [(\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})] \div \text{Cpr}$$

(2) 按照样本质量计算

活性单位定义: 37°C 中每克组织每分钟水解橄榄油生成 1μmol 脂肪酸为一个酶活单位。

$$\text{LPS } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\text{C 标准品} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})] \times \text{V 反总} \div (\text{W} \times \text{V 样} \div \text{V 样总}) \div \text{T} \\ = 16 \times [(\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})] \div \text{W}$$

(3) 按照细菌或者细胞数量计算

活性单位定义: 37°C 中每 10⁴ 个细胞每分钟水解橄榄油生成 1μmol 脂肪酸为一个酶活单位。

$$\text{LPS } (\mu\text{mol}/\text{min}/10^4\text{cell}) = [\text{C 标准品} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})] \times \text{V 反总} \div (\text{细胞数量} \times \text{V 样} \div \text{V 样总}) \div \text{T} \\ = 16 \times [(\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})] \div \text{细胞数量}$$

2. 血清等液体 LPS 活性

活性单位定义: 37°C 中每毫升血清每分钟水解橄榄油生成 1μmol 脂肪酸为一个酶活单位。

$$\text{LPS } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = [\text{C 标准品} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})] \times \text{V 反总} \div \text{V 样} \div \text{T} \\ = 16 \times [(\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})]$$

C 标准品: 10 μmol/mL; V 反总: 反应总体积, 0.8mL; V 样: 反应中加入样本体积, 0.05mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; 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; W: 样本质量, g; T: 催化反应时间, 10 min。