

## 脂肪酶 (LPS) 活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：D100350

规格：50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 90mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 5mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂三	粉剂×1 瓶	2-8°C保存
试剂四	液体 20mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	液体 59.3μL×1 支	2-8°C保存

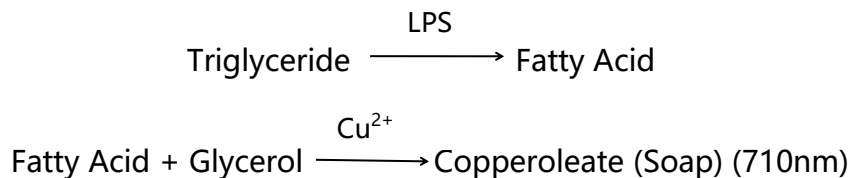
溶液的配制：

1. 试剂三：临用前加入 20mL 蒸馏水，充分震荡搅拌以促进溶解，然后置于沸水浴中煮沸至少 20min 溶解，2-8°C保存 8 周。
2. 工作液的配置：根据样本量按照试剂二:试剂三=1mL:4mL (共 5mL, 约 12T) 的比例混合，高速涡旋震荡 15min，现用现配。
3. 标准品：临用前加入 1.435mL 无水乙醇配成 125μmol/mL 的油酸标准品，充分溶解。用前注意解冻溶解。用不完的试剂可以 2-8°C保存一个月。
4. 15.625μmol/mL 的油酸标准品：取 125μL 125μmol/mL 的油酸标准品，加入 875μL 无水乙醇充分溶解配置成 15.625μmol/mL 的标准品待测。

产品说明：

脂肪酶 (lipase, LPS, EC 3.1.1.3) 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。



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。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者延长反应时间进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、台式离心机、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、1mL 玻璃比色皿、可调式移液枪、甲苯 (>98%, AR)、无水乙醇 (>98%, AR)、冰和蒸馏水。

### 操作步骤:

#### 一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

1. 细胞: 先收集细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细胞数量 ( $10^7$  个) : **试剂一** 体积 (mL) 为 1000-2000: 1 的比例 (建议 1 千万细胞加入 1mL **试剂一**), 超声波破碎细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 共 3min); 4°C, 15000rpm 离心 15min, 取上清液置于冰上待测。
2. 组织样本: 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。4°C, 15000rpm 离心 15min, 取上清液置于冰上待测。
3. 血清样本: 直接检测。若液体有浑浊则离心后进行测定。

**注:** 高脂样本离心后若上清液之上有固态脂类, 需用棉签等擦除后测定。

#### 二、测定步骤

1. 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 710nm, **甲苯** 调零。
2. 试剂一置于 37°C 水浴预热 10min 以上, 试剂二、三、四平衡至常温。
3. 操作表: (在 5mL EP 管中加入下列试剂)

试剂名称 (mL)	空白管	测定管	标准管
试剂一	0.4	0.4	0.4
工作液	0.4	0.4	0.4
蒸馏水	0.4	-	-
样本	-	0.4	-
标准品	-	-	0.4
充分混匀, 置于 37°C, 300r/min 震荡反应 20min			
甲苯	1.6	1.6	1.6
充分混匀, 置于 37°C, 300r/min 震荡反应 5min 后, 4°C 14000rpm 离心 20min, 取上层溶液			
上层溶液	1	1	1
试剂四	0.25	0.25	0.25
37°C, 300r/min 震荡反应 3min, 常温 4000rpm 离心 5min, 小心吸取上层有机相 0.8mL, 加入 1mL 石英比色皿, 于 710nm 处测定吸光值。记为 A 空白、A 测定、A 标准, 计算 $\Delta A$ 测定 = A 测定 - A 空白, $\Delta A$ 标准 = A 标准 - A 空白。标准管和空白管只需做 1-2 次。 <b>注:</b> 1. 若上层溶液取不出 1mL, 建议 4°C 14000rpm 再次离心 20min; 或者统一多加甲苯后离心取上层溶液; 2. 更换溶液清洗比色皿时, 使用甲苯, 勿用清水清洗。			

#### 三、LPS 活性计算

1. 按蛋白浓度计算

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

$$\begin{aligned} \text{LPS 活性(U/mg prot)} &= \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准}) \times V \text{ 样} \div (C_{pr} \times V \text{ 样}) \div T \times F \\ &= 0.78 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div C_{pr} \times F \end{aligned}$$

## 2. 按细胞数量计算

活性单位定义：37°C中每  $10^7$  个细胞每分钟水解橄榄油生成  $1\mu\text{mol}$  脂肪酸为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{LPS 活性(U/}10^7 \text{ cell)} &= \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准}) \times V \text{ 样} \div (N \times V \text{ 样} \div V \text{ 提}) \div T \times F \\ &= 0.78 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div N \times F \end{aligned}$$

## 3. 按样本质量计算

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

$$\begin{aligned} \text{LPS 活性(U/g 质量)} &= \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准}) \times V \text{ 样} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 提}) \div T \times F \\ &= 0.78 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W \times F \end{aligned}$$

## 4. 按血清体积计算

活性单位定义：37°C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。

$$\text{LPS 活性(U/mL)} = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准}) \div T \times F = 0.78 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \times F$$

C 标准：标准品浓度， $15.625\mu\text{mol/mL}$ ；V 样：加入反应体系中样本体积， $0.4\text{mL}$ ；C<sub>pr</sub>：样本蛋白质浓度， $\text{mg/mL}$ ，需要另外测定；T：催化反应时间， $20\text{min}$ ；W：样本质量， $\text{g}$ ；V 提：前处理试剂一体积， $1\text{mL}$ ；N：细胞总数，以  $10^7$  计；F：样本稀释倍数。

### 注意事项：

1. 甲苯有毒，实验过程中需佩戴手套和口罩；实验过程中必须远离火源。
2. 使用  $1\text{mL}$  石英比色皿进行测定时，需用甲苯清洗比色皿，不能用蒸馏水清洗。
3. 如果  $\Delta A$  测定大于 1，建议将样本用提取液稀释后测量。如果  $\Delta A$  测定小于 0.01，可增大样本量后进行测定，计算时注意同步修改计算公式。

### 实验实例：

1. 取  $0.1007\text{g}$  大鼠胰脏，加入  $1\text{mL}$  试剂一进行冰浴匀浆，取上清，使用试剂一稀释 2 倍后按照测定步骤操作，使用  $1\text{mL}$  石英比色皿测得： $\Delta A \text{ 测定} = A \text{ 测定} - A \text{ 空白} = 0.386 - 0.061 = 0.325$ ， $\Delta A \text{ 标准} = A \text{ 标准} - A \text{ 空白} = 0.741 - 0.061 = 0.680$ ，按样本质量计算酶活得：  
 $\text{LPS 活性(U/g 质量)} = 0.78 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W \times F = 7.404\text{U/g 质量}$ 。
2. 取  $0.204\text{g}$  花生种子，加入  $1\text{mL}$  试剂一进行冰浴匀浆，取上清，按照测定步骤操作，使用  $1\text{mL}$  石英比色皿测得： $\Delta A \text{ 测定} = A \text{ 测定} - A \text{ 空白} = 0.100 - 0.061 = 0.039$ ， $\Delta A \text{ 标准} = A \text{ 标准} - A \text{ 空白} = 0.741 - 0.061 = 0.680$ ，按样本质量计算酶活得：  
 $\text{LPS 活性(U/g 质量)} = 0.78 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W \times F = 0.221\text{U/g 质量}$ 。