

组织及血液脂肪酶（LPS）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AMHA7-M96	组织及血液脂肪酶（LPS）试剂盒	96T	微量法

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。

试剂组成：

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 125 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂二	液体 3mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂三	粉剂×1瓶	2-8℃ 保存
试剂四	液体 10 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
标准品	液体 59.3 μL×1 支	2-8℃ 保存

溶液的配制：

- 标准品：临用前加入 1.435 mL 无水乙醇配成 125 μmol/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℃保存一个月。
- 试剂三：临用前加入 12mL 蒸馏水于沸水浴中溶解，2-8℃保存2周。
- 工作液的配制：根据样本量按照试剂二：试剂三=1mL：4mL（5mL，50T）的比例混合，高速涡旋震荡2次，每次3min，间隔5min，现用现配。

操作步骤：

一、样本处理

- 细胞：先收集细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细胞数量（ 10^4 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），超声波破碎细胞（冰浴，功率200W，超声3s，间隔10s，重复30次）；4℃，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℃，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、可见分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至710nm，分光光度计用**甲苯**调零。
- 2、试剂一和工作液置于37℃水浴预热10min以上。
- 3、标准品的稀释：将125μmol/mL的油酸标准品用**无水乙醇**稀释为31.25、15.625、7.8125、3.9、1.95、0.975μmol/mL 的标准品待测。

4、标准品稀释表

序号	稀释前浓度(μmol/mL)	标准品体积(μL)	无水乙醇体积(μL)	稀释后浓度(μmol/mL)
1	125	250	750	31.25
2	31.25	500	500	15.625
3	15.625	500	500	7.8125
4	7.8125	500	500	3.9
5	3.9	500	500	1.95
6	1.95	500	500	0.975

备注：下述实验中每个标准管需 100μL 标准品（注意不要在此步骤直接检测标准品吸光度）。

5、操作表：（在1.5mL 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	0.1	0.1	0.1
工作液	0.1	0.1	0.1
蒸馏水	0.1	-	-
样本	-	0.1	-
标准品	-	-	0.1
迅速震荡混匀后置于37℃水浴准确反应20min			
甲苯	0.4	0.4	0.4
反复涡旋震荡5min后，常温8000rpm离心10min			
取出离心管，小心吸取上层有机相0.3 mL，加入另一离心管中，按下表操作			
试剂四	0.075	0.075	0.075

反复震荡3min；常温4000rpm 离心 10 min，小心吸取上层有机相0.2mL，加入微量玻璃比色皿/96 孔板中，于710nm 处测定吸光值。记为A 空白、A 测定、A 标准，计算 ΔA 测定=A 测定-A 空白， ΔA 标准=A 标准-A 空白。标准曲线和空白管只需做 1-2 次。

三、LPS 活性计算

1、根据标准管的浓度（x，μmol/mL）和吸光度 ΔA 标准（y， ΔA 标准），建立标准曲线。根据标准曲线，将 ΔA 测定（y， ΔA 测定）带入公式计算样本浓度（x，μmol/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 μ mol脂肪酸为一个酶活单位。
LPS活性 (U/mg prot) = $x \times V_{\text{样}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \times F = 0.05 \times x \div C_{\text{pr}} \times F$

(2) 按细胞数量计算

活性单位定义：37℃中每104个细胞每分钟水解橄榄油生成1 μ mol脂肪酸为一个酶活单位。
LPS活性 (U/104 cell) = $x \times V_{\text{样}} \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提}}) \div T \times F = 0.05 \times x \div N \times F$

(3) 按样本质量计算

活性单位定义：37℃中每克组织每分钟水解橄榄油生成1 μ mol脂肪酸为一个酶活单位。
LPS活性 (U/g 质量) = $x \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提}}) \div T \times F = 0.05 \times x \div W \times F$

(4) 按血清体积计算

活性单位定义：37℃中每mL血清每分钟水解橄榄油生成1 μ mol脂肪酸为一个酶活单位。
LPS活性 (U/mL) = $x \div T \times F = 0.05 \times x \times F$

V样：加入反应体系中样本体积，0.1mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL，需要另外测定；
T：催化反应时间，20min；W：样本质量，g；V提：前处理试剂一体积，1mL；N：细胞总数，以104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。
- 2、实验过程中须远离火源。
- 3、如果ΔA测定大于1，建议将样本用提取液稀释后测量。如果ΔA测定小于0.04，可适当延长37℃水浴时间。计算时注意同步修改计算公式。
- 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。