

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
PYHE1-M48	脂肪酶(LPS)活性检测试剂盒	48T	微量法
PYHE1-M96		96T	

一、测定意义

脂肪酶（LPS）又称甘油酯水解酶，属于催化长链酯键水解和形成的酶类，对油水界面具有亲和力，可催化甘油三酯水解生成脂肪酸和甘油（或甘油二酯和单酯）。脂肪酶普遍存在于动植物组织及微生物中，其活性测定对于脂肪代谢分析具有重要意义。

二、测定原理

脂肪酶催化油脂水解成游离脂肪酸，利用铜皂法测定脂肪酸生成速率：脂肪酸与显色剂中铜离子反应生成铜皂蓝色络合物，产物在 710 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可表征脂肪酶活性。

三、试剂组成

试剂名称	试剂装量（48T）	试剂装量（96T）	保存条件
试剂一	液体 60 mL×1 瓶	液体 120 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 3 mL×1 瓶	液体 6 mL×1 瓶	常温避光保存
试剂三	液体 5 mL×1 瓶	液体 10 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体×1 支	液体×2 支	2-8℃避光保存
标准品的配制：使用前每瓶加入 1 mL 无水乙醇（自备）充分溶解，即为 120 μmol/mL 油酸标准液。			

四、操作步骤

一、样本预处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

取一定量植物组织擦净水分及杂质，剪碎后放入研钵，加入液氮，研磨成粉状后转移出来，然后准确称重，称取 0.1 g 组织样本于 1mL EP 管中，加入 1 mL 试剂一，冰浴破碎匀浆，4℃ 8000 g 常温离心 10 min，取上清液即为待测样本。

二、测定步骤

- 1、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 710nm，甲苯调零；
- 2、试验前将试剂一和试剂二 37℃预热 30 min；
- 3、标准稀释液的制备：使用前将 120 μmol/mL 油酸标准液使用无水乙醇稀释至 60、30、15、7.5、3.75、1.875 μmol/mL 即为标准稀释液。
- 4、操作表（在离心管中依次加入下列试剂）：

试剂名称	测定管	标准管	空白管
试剂一 (μL)	150	150	150
试剂二 (μL)	50	50	50
反复振荡混匀			
样本 (μL)	80	-	-
标准液 (μL)	-	80	-
蒸馏水 (μL)	-	-	80
迅速振荡混匀, 37°C准确反应 10 min			
甲苯 (μL)	400	400	400
反复振荡混匀, 8000 g 常温离心 10 min, 取上清			
上清液 (μL)	300	300	300
试剂三 (μL)	75	75	75
反复振荡混匀, 8000 g 常温离心 10 min, 吸取 200 μL 上层溶液至 96 孔板中, 测定 710 nm 处吸光值, 记为 A _{测定} 、A _{标准} 和 A _{空白} ; 计算ΔA _{测定} =A _{测定} -A _{空白} , ΔA _{标准} =A _{标准} -A _{空白} 。注: 空白管只需测定 1-2 次。			

五、脂肪酶 (LPS) 活性计算：

1、标准曲线的建立：根据标准管的浓度(y, μmol/mL)和吸光度 ΔA_{标准}(x, ΔA_{标准})，建立标准曲线。根据标准曲线，将 ΔA_{测定}(x, ΔA_{测定})带入公式计算样本浓度(y, μmol/mL)。

2、按组织蛋白浓度计算

单位定义：单位定义：37°C条件下，每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 μmol 脂肪酸定义为一个酶活单位。

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

3、按组织样本质量计算

单位定义：单位定义：37°C条件下，每 g 组织每分钟生成 1 μmol 脂肪酸定义为一个酶活单位。

$$\text{LPS (U/g)} = y \times V_{\text{样}} \times V_{\text{提}} \div (W \times V_{\text{样}} \times T) = 0.1 \times y \div W$$

V_样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.08mL；V_提：粗酶液总体积，1 mL；Cpr：粗酶液蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；T：反应时间，10 min。

六、注意事项：

- 1、实验过程中须远离火源，甲苯具有毒性，建议在通风橱中操作并做好防护措施；
- 2、若测定吸光值超出标准吸光值线性范围：高于最高值建议将粗酶液使用试剂一适当稀释后再进行测定，低于最低值建议适当增加样本量后再进行测定，计算时相应修改；

3、为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。