

脂肪酶(LPS)活性检测试剂盒说明书

(货号: ADS-W-ZF005 微板法 96 样)

有效期: 3 个月

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。

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、无水乙醇、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制:

试剂一: 液体 50ml×2 瓶, 4℃ 保存。

试剂二: 液体 5ml×1 瓶, 室温保存。

试剂三: 液体 5ml×1 瓶, 4℃ 保存。

标准品: 液体 10 μl×1 瓶, 10 μmol/mL 的标准溶液, 室温保存。临用前加入 3.168 mL 无水乙醇, 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 (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), 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. 液体: 直接检测。

LPS 测定操作:

1. 分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上, 调节波长到 710 nm。
2. 试剂一和试剂二置于 37℃ 水浴预热 30min 以上。
3. **空白管:** 取 1.5 mL EP 管, 依次加入 150μL 试剂一和 50μL 试剂二, 反复震荡混匀; 加入 5μL 蒸馏水, 迅速震荡混匀后置于 37℃ 水浴准确反应 10 min; 加入 400μL 甲苯, 反复震荡混匀后, 室温 4000rpm 离心 10min; 取出离心管, 小心吸取上层溶液 200μL, 加入另一 1.5mL EP 管, 再加入 50μL 试剂三, 反复震荡混匀; 室温 4000rpm 离心 10min, 小心吸取上层溶液 150μL, 加入微量石英比色皿/96 孔板, 于 710nm 处测定吸光值。记为 A 空白管。
4. **标准管:** 取 1.5 mL EP 管, 依次加入 150μL 试剂一和 50μL 试剂二, 反复震荡混匀; 加入 5μL 标准品, 迅速震荡混匀后置于 37℃ 水浴准确反应 10min; 加入 400μL 甲苯, 反复震荡混匀后, 室温 4000rpm 离心 10min; 取出离心管, 小心吸取上层溶液 200μL, 加入另一 1.5mL EP 管, 再加入 50μL 试剂三, 反复震荡混匀; 室温 4000rpm 离心 10min, 小心吸取上层溶液 150μL, 加入微量石英比色皿/96 孔板, 于 710nm 处测定吸光值。记为 A 标准管。
5. **测定管:** 取 1.5mL EP 管, 依次加入 150μL 试剂一和 50μL 试剂二, 反复震荡混匀; 加入 5μL 上清液, 迅速震荡混匀后置于 37℃ 水浴准确反应 10min; 加入 400μL 甲苯, 反复震荡混匀后, 室温 4000rpm 离心 10min; 取出离心管, 小心吸取上层溶液 200μL, 加入另一 1.5mL EP 管, 再加入 50 μL 试剂三, 反复震荡混匀; 室温 4000rpm 离心 10 min, 小心吸取上层溶液 150 μL, 加入微量石英比色皿/96 孔板, 于 710nm 处测定吸光值。记为 A 测定管。

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 μ mol 脂肪酸。

LPS (U/mg prot)

$$=[C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})] \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T$$
$$=1 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div Cpr$$

(2) 按鲜重计算

活性单位定义: 37°C中每克样本每分钟水解橄榄油生成 1 μ mol 脂肪酸。

LPS (U/mg prot)

$$=[C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$$
$$=1 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div W$$

(3) 按液体样本计算

活性单位定义: 37°C中每毫升样本每分钟水解橄榄油生成 1 μ mol 脂肪酸。

LPS (U/ml)

$$=[C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})] \div V \text{ 样} \div T$$
$$=1 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})$$

(4) 按细菌、细胞数量计算

活性单位定义: 37°C中每 10⁴个细菌、细胞每分钟水解橄榄油生成 1 μ mol 脂肪酸。

LPS (U/mg prot)

$$=[C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})] \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$$
$$=1 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div \text{细胞数量}$$

C 标准品: 10 μ mol/mL; V 标准品: 加入反应体系中标准品体积, 0.005 mL; V 样总: 上清液总体积, 1 mL; V 样: 加入反应体系中上清液体积, 0.005 mL; Cpr: 上清液蛋白质浓度, mg/mL; W : 样品质量; T: 催化反应时间, 10 min。

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。