

脂肪酶（LPS）活性检测试剂盒说明书

微量法

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：BC2345

规格：100T/96S

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

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 3 mL×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

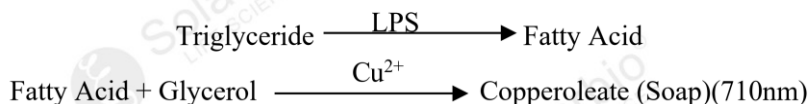
溶液的配制：

1. 试剂三：临用前加入 12mL 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℃保存 8 周。
2. 工作液的配制：根据样本量按照试剂二：试剂三=1mL：4mL（共 5mL，约 33T）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 1.435 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。
4. 15.625μmol/mL 的油酸标准品：取 125μL 125 μmol/mL 的油酸标准品，加入 875μL 无水乙醇充分溶解配制成 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。



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/酶标仪、台式离心机、微量石英比色皿/96孔板（非聚苯乙烯材质）、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、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℃，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、试剂一置于37℃水浴预热10min以上，试剂二、三、四平衡至常温。
- 3、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	0.15	0.15	0.15
工作液	0.15	0.15	0.15
蒸馏水	0.15	-	-
样本	-	0.15	-
标准品	-	-	0.15
充分混匀，置于37℃，300r/min震荡反应20 min			
甲苯	0.6	0.6	0.6
充分混匀，置于37℃，300r/min震荡反应5min后，4℃ 14000rpm离心20 min，取上层溶液			
上层溶液	0.3	0.3	0.3
试剂四	0.075	0.075	0.075
37℃，300r/min震荡反应3min，常温4000rpm离心5 min，小心吸取上层有机相0.2mL，加入微量石英比色皿/96孔板中（非聚苯乙烯材质），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。			
注：1. 若上层溶液取不出0.3mL，建议4℃ 14000rpm再次离心20min；或者统一多加甲苯后离心取上层溶液。			

三、LPS活性计算

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。

$$\text{LPS活性 (U/mg prot)} = \Delta A_{测定} \div (\Delta A_{标准} \div C_{标准}) \times V_{样} \div (C_{pr} \times V_{样}) \div T \times F = 0.78 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div C_{pr} \times F$$

(2) 按细胞数量计算

活性单位定义：37℃中每 10^7 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。

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

(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。

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



(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1μmol脂肪酸为一个酶活单位。

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，15.625μmol/mL；V样：加入反应体系中样本体积，0.15mL；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10⁷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、如果使用微量石英比色皿进行测定，需用甲苯清洗比色皿，不能用蒸馏水清洗。
- 3、如果使用酶标板进行试验，建议选用非聚苯乙烯材质的96孔板。
- 4、如果ΔA测定大于0.8，建议将样本用提取液稀释后测定。如果ΔA测定小于0.015，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 0.1007g 大鼠胰脏，加入 1mL 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，用 96 孔石英板测得：ΔA 测定-A 测定-A 空白=0.323-0.100=0.223，ΔA 标准-A 标准-A 空白=0.539-0.100=0.439，按样本质量计算酶活得：
LPS 活性(U/g 质量) = $0.78 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F = 7.869 \text{ U/g 质量}$ 。
- 2、取 0.2024g 花生，加入 1mL 试剂一进行冰浴匀浆，取上清，按照测定步骤操作，使用 96 孔石英板测得：ΔA 测定=A 测定-A 空白=0.123-0.100=0.023，ΔA 标准=A 标准-A 空白=0.539-0.100=0.439，按样本质量计算酶活得：
LPS 活性 (U/g 质量) = $0.78 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F = 0.202 \text{ U/g 质量}$ 。

相关发表文献：

- [1] Ye S, Zhao L, Qi Y, Yang H, Hu Z, Hao N, Li Y, Tian X. Identification of azukisapogenol triterpenoid saponins from *Oxytropis hirta* Bunge and their aphicidal activities against pea aphid *Acyrtosiphon pisum* Harris. *Pest Manag Sci*. 2023 Jan;79(1):55-67. doi: 10.1002/ps.7172. Epub 2022 Sep 26. PMID: 36067067.
- [2] Ma J, Zhu Y, Wang Z, Yu X, Hu R, Wang X, Cao G, Zou H, Shah AM, Peng Q, Xue B, Wang L, Zhao S, Kong X. Glutamine supplementation affected the gut bacterial community and fermentation leading to improved nutrient digestibility in growth-retarded yaks. *FEMS Microbiol Ecol*. 2021 Jul 1;97(7): fiab084. doi: 10.1093/femsec/fiab084. PMID: 34132351.
- [3] Qian W, Guo M, Peng J, Zhao T, Li Z, Yang Y, Li H, Zhang X, King-Jones K, Cheng D. Decapentaplegic retards lipolysis during metamorphosis in *Bombyx mori* and *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2023 Apr; 155:103928. doi: 10.1016/j.ibmb.2023.103928. Epub 2023 Mar 2. PMID: 36870515.
- [4] Cheng S, Li B, Ding Y, Hou B, Hung W, He J, Jiang Y, Zhang Y, Man C. The probiotic fermented milk of *Lactocaseibacillus paracasei* JY062 and *Lactobacillus gasseri* JM1 alleviates constipation via improving gastrointestinal motility and gut microbiota. *J Dairy Sci*. 2023 Nov 1: S0022-0302(23)00777-4. doi: 10.3168/jds.2023-24154.





[5] Chen Y, Tao H, Chen R, Pan Y, Wang J, Gao R, Chen J, Yang J. Biomimetic Nanoparticles Loaded with Ulinastatin for the Targeted Treatment of Acute Pancreatitis. Mol Pharm. 2023 Aug 7;20(8):4108-4119. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.3c00238. Epub 2023 Jun 22. PMID: 37349264.

参考文献:

[1] Kwon, Dae Y. , and J. S. Rhee . "A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay." Journal of the American Oil Chemists' Society 63.1(1986):89-92.

[2] Hou Aijun et al." Improved copper soap-Spectrophotometry for determination of lipase activity." Leather Science and Engineering 1(2011):6.

相关系列产品:

BC0590/BC0595 游离脂肪酸 (FFA) 含量检测试剂盒

BC1080/BC1085 乙醇脱氢酶 (ADH) 活性检测试剂盒

BC0320/BC0325 植物中脂氧合酶 (LOX) 活性检测试剂盒

