

脂肪酶（LPS）活性试剂盒说明书

（货号：BP10175W 微板法 96 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

脂肪酶(EC 3.1.1.3)是一种特殊的酯键水解酶，能催化天然油脂水解，在食品、医药、洗涤剂 and 皮革等许多工业领域中都有广泛的应用。

本试剂盒提供一种简单、快速的检测方法，以对硝基苯酚酯作为底物，脂肪酶水解底物产生具有颜色的对硝基苯酚，在405nm波长下测定其吸光值，即可得出脂肪酶活力。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	A 粉体：mg×1 瓶 B 液：6mL×1 瓶	-20℃避光保存	1. 临用前甩几下，使微量 A 粉体落到底部； 2. 再向 A 中加入 6mL B 液，混匀备用，用不完的试剂可-20℃分装保存。
试剂二	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4℃避光保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

① 组织样本：

称取约 0.1g 组织（含水量高的样本可取 0.5g）加入研钵中，加入 1mL 提取液，在冰上进行匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液；冰浴超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后 12000rpm，4℃离心 10min，取上清置于冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌或细胞数量（10⁴ 个）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 液体样本：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

2、检测步骤：

① 酶标仪预热 30 min，调节波长到 405 nm。

② 在 96 孔板中依次加入：

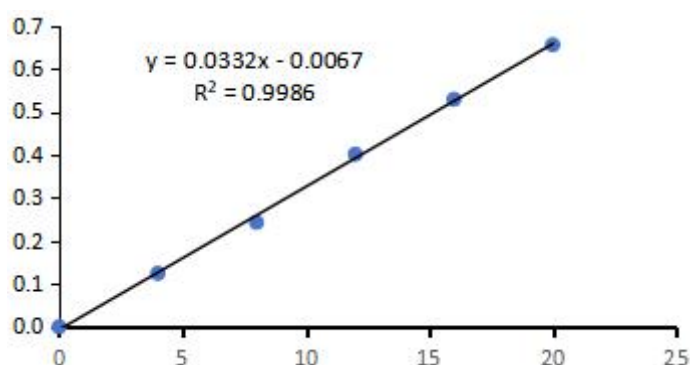
试剂组分（μL）	测定管
----------	-----

试剂一	40
试剂二	150
样本	10
混匀，30℃条件下，立即于 405nm 处读取吸光值 A1，10min 后读取 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

- 【注】1. 若 ΔA 值在零附近，可以延长反应时间 T（如至 20min），或增加样本量 V1（如 30 μ L，则试剂二相应减少）；若 10min 后的 A2 值大于 1.5 或更高可缩短反应时间 T（如减至 5min 或更短）；则改变后的反应时间 T 和样本量 V1 需代入公式重新计算。
2. 若样本自身色素较高，导致起始 A1 值大于 1.0，则可减少样本量 V1（如减至 5 μ L，则试剂二相应增加），则改变后的样本量 V1 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.0332x - 0.0067$ ，x 是标准品摩尔质量（nmol），y 是 ΔA 。



2、按照蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟释放出 1nmol 对硝基苯酚的酶量定义为一个酶活力单位。

$$LPS (nmol/min/mg \text{ prot}) = [(\Delta A + 0.0067) \div 0.0332] \div (Cpr \times V1) \div T = 301.2 \times (\Delta A + 0.0067) \div Cpr$$

3、按照样本质量计算：

酶活定义：每克组织每分钟释放出 1nmol 对硝基苯酚的酶量定义为一个酶活力单位。

$$LPS (nmol/min/g \text{ 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0067) \div 0.0332] \div (W \times V1 \div V) \div T = 301.2 \times (\Delta A + 0.0067) \div W$$

4、按照细菌/细胞数量计算：

酶活定义：每 10^4 个细胞每分钟释放出 1nmol 对硝基苯酚的酶量定义为一个酶活力单位。

$$LPS (nmol/min/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0067) \div 0.0332] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.602 \times (\Delta A + 0.0067)$$

5、按照液体样本计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟释放出 1nmol 对硝基苯酚的酶量定义为一个酶活力单位。

$$LPS (nmol/min/mL) = [(\Delta A + 0.0067) \div 0.0332] \div V1 \div T = 301.2 \times (\Delta A + 0.0067)$$

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.01mL；

T---反应时间，10 min。

500---细菌/细胞数量； W---样本质量，g；

Cpr---上清液蛋白质浓度，mg/mL，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒；

附：标准曲线制作过程：

- 1 向标准品 EP 管里面加入 1ml 蒸馏水得到标准母液，标准品母液浓度为 20 μ mol/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2 μ mol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 100uL，加入 900uL 蒸馏水，混匀得到 2μmol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μmol/mL	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据以下加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	10	
蒸馏水		10
B 液	40	40
试剂二	150	150
混匀，于 405nm 下读取吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{0 浓度管}}$		