



亮氨酸氨基肽酶活性检测试剂盒

LAP Assay Kit

微量法

产品编号：AK386M

产品规格：100T/96S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
ES386	100mL×1 瓶	4℃保存；
AK386-A	15mL×1 瓶	4℃保存；
AK386-B	粉剂×1 瓶	-20℃保存；

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介：

意义：亮氨酸氨基肽酶（Leucine Aminopeptidase, LAP）是一类能水解肽链 N-末端为亮氨酸的酶，广泛存在于肝、肾、胰等组织中，尤其以肝脏中含量最为丰富。各类肝病患者因肝细胞损伤，血清 LAP 的活性均有不同程度的升高，因此，血清 LAP 活性的检测能从不同侧面反映各种肝病的发生和发展。

原理：LAP 分解 L-亮氨酸对硝基苯胺生成对硝基苯胺，后者在 405nm 有最大吸收峰，通过测定吸光值升高速率来计算 LAP 活性。

自备用品：

酶标仪/可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、96 孔板/微量石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

样本的前处理：

1. 细菌、细胞样品的制备：细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：ES386 体积（mL）为 1000~5000：1 的比例（建议 2000 万细菌或细胞加入 1mLES386），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
2. 组织样品的制备：按照组织质量（g）：ES386 体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mLES386），进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
3. 血清（浆）样品：直接检测。

测定步骤：

1. 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 405nm，蒸馏水调零。
2. 将 AK386-B 转移至 AK386-A 中充分溶解（如较难溶解，可 50℃水浴加热约 30min 促进溶解）；在 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 10min 以上；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。
3. 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 50μL 样本和 150μL AK386-A，混匀后立即记录 405nm 处初始吸光值 A1 和 2min 后的吸光值 A2，计算 $\Delta A=A2-A1$ 。

注意事项：若 ΔA 大于 0.5，需将酶液用 ES386 稀释，计算公式中乘以相应稀释倍数。使 A2-A1 小于 0.5，可提高检测灵敏度。

LAP 活力单位的计算：

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 血清（浆）LAP 活力的计算：

单位的定义：每 mL 血清（浆）每分钟生成 1 nmol 的对硝基苯胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{LAP (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T = 205.8 \times \Delta A$$

2. 组织、细菌或细胞中 LAP 活力的计算:

(1) 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol 对硝基苯胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{LAP (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T = 205.8 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每 g 组织每分钟生成 1 nmol 对硝基苯胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{LAP (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 205.8 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol 对硝基苯胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{LAP (nmol/min /}10^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (2000 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 0.103 \times \Delta A$$

注: V 反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : 对硝基苯胺摩尔消光系数, 9.72×10^3 L / mol / cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.05 mL; V 样总: 加入 ES386 体积, 1 mL; T: 反应时间, 2 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 2000: 细菌或细胞总数, 2000 万。

b. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 血清(浆) LAP 活力的计算:

单位的定义: 每 mL 血清(浆) 每分钟生成 1 nmol 的对硝基苯胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{LAP (nmol/min /mL)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T = 411.5 \times \Delta A$$

2. 组织、细菌或细胞中 LAP 活力的计算:

(1) 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol 对硝基苯胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{LAP (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T = 411.5 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每 g 组织每分钟生成 1 nmol 对硝基苯胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{LAP (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 411.5 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol 对硝基苯胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{LAP (nmol/min /}10^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (2000 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 0.206 \times \Delta A$$

注: V 反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : 对硝基苯胺摩尔消光系数, 9.72×10^3 L / mol / cm; d: 96 孔板光径, 0.5cm; V 样: 加入样本体积, 0.05 mL; V 样总: 加入 ES386 体积, 1 mL; T: 反应时间, 2min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 2000: 细菌或细胞总数, 2000 万。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司: BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))