



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/微量玻璃比色皿、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 50min 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. 在微量玻璃比色皿或 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。

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

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。

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

(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。

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

(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。

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

注: $V_{\text{反总}}$: 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; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.05 mL; $V_{\text{样总}}$: 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 96 孔板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。

$$\text{LAP (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 411.6 \times \Delta A$$

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。

$$\text{LAP (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 411.6 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{LAP (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 411.6 \times \Delta A \div W$$

(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。

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

注: $V_{\text{反总}}$: 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; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.05 mL; $V_{\text{样总}}$: 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](#))