

亮氨酸氨基肽酶 (LAP)活性检测试剂盒 (微量法)
(本试剂盒仅供科研使用)**产品包装**

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0626	亮氨酸氨基肽酶 (LAP) 酶活性检测试剂盒 (微量法)	100 管/96 样

产品内容

名称	规格	储存条件
试剂一	液体 120mL × 1 瓶	4℃
试剂二	粉剂 × 1 瓶: 临用前加入 2.5 mL 蒸馏水溶解。	4℃

一、产品说明

亮氨酸氨基肽酶 (LAP) 是一种膜结合酶, 广泛存在于肝、胆、胰等组织中, 参与组织蛋白和某些肽类的降解更新。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, LAP 可以作为各类肝病的一项初步检测指标, 特别是肝癌鉴别诊断的指标。

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。

二、自备材料

天平、低温离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、丙酮、匀浆器/研钵、冰、蒸馏水。

三、样本处理

- 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, 10000g 4℃ 离心 10min, 取上清置于冰上待测。
- 2、细胞或细菌: 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); 10000g 4℃ 离心 10min, 取上清置于冰上待测。
- 3、液体样本: 直接检测。

四、操作步骤

正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

- 1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 405nm。
- 2、操作表 (在微量玻璃比色皿或 96 孔板中直接加入) :

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
样本		10
上清液	10	
试剂一	170	170
试剂二	20	20
充分混匀后于 405nm 处测定 30s 时的吸光值 A1, 迅速置于 37℃ 水浴 3min (有控温功能的酶标仪可以将温度调至 37℃), 拿出迅速擦干测定 210s 时的吸光值 A2, 计算 ΔA 测定管		

=A2 测定-A1 测定, ΔA 空白管=A2 空白-A1 空白, $\Delta A = \Delta A$ 测定管- ΔA 空白管 (空白管只需做 1-2 次)。

五、酶活的计算

A. 用 96 孔板测定的计算公式如下:

标准曲线: $y = 1.4216x - 0.0293$, $R^2 = 0.9985$ 。

1、按照蛋白浓度计算

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

$$\text{LAP (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 1125.7 \times \Delta A \div \text{Cpr}。$$

2、按照样本鲜重计算

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

$$\text{LAP (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1125.7 \times \Delta A \div W。$$

3、按照细胞或者细菌数量计算

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

$$\text{LAP (U/10}^4\text{ ceLL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.25 \times \Delta A。$$

4、按照液体体积计算

酶活定义: 每 mL 血液每分钟生成 1nmol 的对硝基苯胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{LAP (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 1125.7 \times \Delta A。$$

B. 用微量玻璃比色皿测定的计算公式如下:

1、按照组织蛋白浓度计算

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

$$\text{LAP (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 675.4 \times \Delta A \div \text{Cpr}。$$

2、按照样本鲜重计算

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

$$\text{LAP (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 675.4 \times \Delta A \div W。$$

3、按照细胞或者细菌数量计算

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

$$\text{LAP (U/10}^4\text{ ceLL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.35 \times \Delta A。$$

4、按照液体体积计算

酶活定义: 每 mL 血液每分钟生成 1nmol 的对硝基苯胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{LAP (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 675.4 \times \Delta A。$$

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, 9.87×10^3 L/mol/cm; 10^9 : 单位换算系数, $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$; d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.01mL; V 样总: 加入试剂一体积, 1mL; T: 反应时间, 3min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细胞总数, 500 万。

六、注意事项

- 1、 ΔA 大于 0.5 时或者 A 值大于 1.5 时建议将样本上清用试剂一稀释后再进行测定。
- 2、空白管的 ΔA 变化小于 0.01。

七、计算示例

1、取 0.1g 小鼠肾脏加入 1mL 试剂一进行匀浆研磨, 取上清按照测定步骤操作, 用微量玻璃比色皿测得计算 ΔA 测定管= A2 测定-A1 测定=0.4537-0.3691=0.0846, ΔA 空白管=A2 空白-A1 空白=0.0157-0.0133=0.0024, $\Delta A = \Delta A$ 测定管- ΔA 空白=0.0846-0.0024=0.0822, 按样本质量计算酶活得:

LAP (U/g 质量) = $675.4 \times \Delta A \div W = 675.4 \times 0.0822 \div 0.1 = 555.1788$ U/g 质量。

2、取鸡血清直接按照测定步骤操作, 用微量玻璃比色皿测得计算 ΔA 测定管= A2 测定-A1 测定 =0.094- 0.0798=0.0142, ΔA 空白管=A2 空白-A1 空白=0.0157-0.0133=0.0024, $\Delta A = \Delta A$ 测定管- ΔA 空白管=0.0142- 0.0024=0.0118,

按样本体积计算酶活得:

LAP (U/g 质量) = $675.4 \times \Delta A = 675.4 \times 0.0118 = 7.9697$ U/g 质量。