

## 亮氨酸氨基肽酶 (Leucine Aminopeptidase, LAP) 试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

### 测定意义:

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。

### 测定原理:

LAP 分解 L-亮氨酰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。

### 组成:

产品名称	AC010-100T/96S	Storage
提取液: 液体	100ml	4°C
试剂一: 液体	15ml	4°C
试剂二: 粉剂	1 瓶	-20°C
说明书	1 份	

### 自备仪器和用品:

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。

### 样品的前处理:

#### 1、细菌、细胞或组织样品的制备:

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): 提取液体积 (ml) 为 1000~5000: 1 的比例 (建议 2000 万细菌或细胞加入 1ml 提取液), 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°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

组织: 按照组织质量 (g): 提取液体积(ml)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1ml 提取液), 进行冰浴匀浆。8000g 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

#### 2、血清 (浆) 样品: 直接检测。

### LAP 测定步骤:

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司

江苏省连云港市海州区花果山大道 17 号



服务热线: 0518-81263339

官网:<http://www.bio149.com>

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、将试剂二转移至试剂一中充分溶解（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 试剂一，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 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

注意事项：若 $\Delta A$  大于 0.5，需将酶液用提取液稀释，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.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。

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

V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：对硝基苯胺摩尔消光系数， $9.72 \times 10^3$  L / mol / cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.05 ml；V 样总：加入提取液体积，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。

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

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。

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

V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\varepsilon$ ：对硝基苯胺摩尔消光系数， $9.72 \times 10^3$  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：加入提取液体积，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。

$$\text{GOT (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0013) \div 0.2384 \times V_1] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T \times 10^3 = 209.7 \times (\Delta A + 0.0013) \div \text{Cpr}$$

需要另外测定，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟催化产生 1nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{GOT (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0013) \div 0.2384 \times V_1] \div (W \times V_1 \div V_2) \div T \times 10^3 = 209.7 \times (\Delta A + 0.0013) \div W$$

(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催化产生 1nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{GOT (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0013) \div 0.2384 \times V_1] \div (500 \times V_1 \div V_2) \div T \times 10^3 = 0.419 \times (\Delta A + 0.0013)$$

V1：加入反应体系中样本体积，0.01ml；V2：加入提取液体积，1 ml；T：反应时间，20 min；Cpr：蛋白质浓度，mg/ml；W：样本质量，g；500：细胞或细菌总数，500 万； $10^3$ ： $1 \mu\text{mol/ml} = 10^3 \text{ nmol/ml}$ 。

1、标准曲线线性范围为：0.01  $\mu\text{mol/ml}$  - 2  $\mu\text{mol/ml}$ 。

2、 $\Delta A$  线性范围为：0.01 - 1。

