

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0914

Size: 100T/96S

亮氨酸氨基肽酶（LAP）检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定（如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测）。

一、测定意义：

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。

二、测定原理：

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。

三、需自备的仪器和用品：

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。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 120mL × 1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 × 1 瓶	4℃ 保存	

五、操作步骤：

● 样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

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，然后，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）；然后 10000g，4℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。

3、液体：直接检测。

● 测定步骤

1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，波长调至 405nm，分光光度计蒸馏水调零。

2、加样表：在微量玻璃比色皿/96 孔板中分别加入下列试剂

试剂名称（ μ L）	测定管	空白管
试剂一		10
样本上清	10	
试剂一	170	170
试剂二	20	20

在微量玻璃比色皿/96 孔板中分别加入上述试剂，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）。

六、LAP 酶活计算

● 按微量玻璃比色皿计算：

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 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、按样本质量计算：

单位的定义：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。

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

3、按细胞数量计算：

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

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

4、按液体体积计算：

单位的定义：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。

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

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $2 \times 10^{-4} \text{L}$; ϵ : 对硝基苯胺摩尔消光系数, $9.87 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$;
 10^9 : 单位换算系数, $1 \text{mol} = 10^9 \text{nmol}$; d : 比色皿光径, 1cm ; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.01mL ;
 $V_{\text{样总}}$: 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 。

● 按 96 孔板计算：

将上述计算公式中的 $d=1\text{cm}$ 改为 $d=0.6\text{cm}$ (96 孔板光径) 进行计算即可。

七、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。

八、实验实例：

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 = A_2 测定 - A_1 测定 = $0.4537 - 0.3691 = 0.0846$, ΔA 空白管 = A_2 空白 - A_1 空白 = $0.0157 - 0.0133 = 0.0024$, $\Delta A = \Delta A$ 测定管 - ΔA 空白管 = $0.0846 - 0.0024 = 0.0822$ ，按样本质量计算酶活得：

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

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 = A_2 测定 - A_1 测定 = $0.094 - 0.0798 = 0.0142$ ， ΔA 空白管 = A_2 空白 - A_1 空白 = $0.0157 - 0.0133 = 0.0024$ ， $\Delta A = \Delta A$ 测定管 - ΔA 空白管 = $0.0142 - 0.0024 = 0.0118$ ，按样本质量计算酶活得：

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