

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-S0915

Size: 50T/48S

亮氨酸氨基肽酶 (LAP) 检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*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、1mL 玻璃比色皿、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 100 mL×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、分光光度计预热 30min 以上，波长调至 405nm，蒸馏水调零。

2、加样表：在 1mL 玻璃比色皿中分别加入下列试剂

试剂名称（ μ L）	测定管	空白管
试剂一		50
样本上清	50	
试剂一	850	850
试剂二	100	100

在 1mL 玻璃比色皿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，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

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。

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

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 液体每分钟生成 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, 1×10^{-3} 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; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.05mL;
 $V_{\text{样总}}$: 加入试剂一体积, 1mL; T : 反应时间, 3min; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL, 需单独测定; W : 样本质量, g; 500: 细胞总数, 500 万。

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，测得计算

$$\Delta A \text{ 测定管} = A2 \text{ 测定} - A1 \text{ 测定} = 0.451 - 0.372 = 0.079,$$

$$\Delta A \text{ 空白管} = A2 \text{ 空白} - A1 \text{ 空白} = 0.012 - 0.011 = 0.001,$$

$$\Delta A = \Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管} = 0.079 - 0.001 = 0.078$$

按样本质量计算酶活得：

$$\text{LAP (U/g 质量)} = 675.4 \times \Delta A \div W = 675.4 \times 0.078 \div 0.1 = 526.812 \text{ U/g 质量}。$$

2. 取鸡血清直接按照测定步骤操作，测得计算

$$\Delta A \text{ 测定管} = A2 \text{ 测定} - A1 \text{ 测定} = 0.165 - 0.148 = 0.017,$$

$$\Delta A \text{ 空白管} = A2 \text{ 空白} - A1 \text{ 空白} = 0.012 - 0.011 = 0.001,$$

$$\Delta A = \Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管} = 0.017 - 0.001 = 0.016,$$

按样本质量计算酶活得：

$$\text{LAP (U/g 质量)} = 675.4 \times \Delta A = 675.4 \times 0.016 = 10.8064 \text{ U/g 质量}。$$