



亮氨酸氨基肽酶 (LAP) 活性检测试剂盒
Leucine Aminopeptidase (LAP) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



亮氨酸氨基肽酶 (LAP) 活性检测试剂盒

Leucine Aminopeptidase (LAP) Activity Assay Kit

一、产品描述

亮氨酸氨基肽酶 (LAP) 是一种膜结合蛋白分解酶, 广泛分布于肝、胰、肾等组织中, 能水解肽链 N 端并由亮氨酸与其他氨基酸形成肽键, 参与组织蛋白和肽类的降解更新。亮氨酸氨基肽酶可作为肝脏疾病初步检测的一项重要指标, 特别是肝癌的鉴别诊断。

亮氨酸氨基肽酶可催化 L-亮氨酸对硝基苯胺生成对硝基苯胺, 产物在 405 nm 处具有特征吸收峰, 通过吸光值变化即可表征亮氨酸氨基肽酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 130 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	粉剂×2 支	4°C 避光保存	使用前每支加入 1.5 mL 丙酮充分溶解 (配制后 4°C 可保存一周, 注意密封保存)

需自备试剂: 丙酮 (C₃H₆O, MW=58.08, CAS:67-64-1);

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器及试剂: 可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿 (光径 10 mm) /96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱、丙酮和蒸馏水。

1. 粗酶液的制备 (可根据预实验结果适当调整样本量及比例)

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 0.1 g 组织, 加入 1 mL 试剂一) 处理样品, 冰浴匀浆, 4°C 12000 g 离心 10 min, 取上清置于冰上待测。

②细菌或细胞: 离心收集细菌或细胞至离心管内, 按照细菌或细胞数量 (10⁴ 个): 试剂一体积 (mL) 为 (500-1000): 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 试剂一) 处理样品, 冰浴超声破碎 (功率 300 W, 超声 3 s, 间隔 7 s, 总时间 3 min), 4°C 12000 g 离心 10 min, 取上清置于冰上待测。

③血清 (浆)、培养液等液体样本: 直接检测或适当稀释后进行检测。

2.测定步骤

- ①分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，波长调至 405 nm，蒸馏水调零。
- ②在 96 孔板或微量玻璃比色皿中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)	空白组 (μL)
粗酶液	10	-
试剂一	170	180
试剂二	20	20

吸光值测定：①充分混匀并立即开始计时，测定 30 s（总时间）时 405 nm 处吸光值，记为 A1 测定和 A1 空白；②37°C 准确反应 180 s，测定 210 s（总时间）时 405 nm 处吸光值，记为 A2 测定和 A2 空白；③计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A2_{\text{测定}} - A1_{\text{测定}}$ ， $\Delta A_{\text{空白}} = A2_{\text{空白}} - A1_{\text{空白}}$ ， $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}$ 。注：空白组只需测定 1-2 次。

3.亮氨酸氨基肽酶（LAP）活性计算

3.1 使用 96 孔板测定的计算公式

- ①按组织蛋白浓度计算

单位定义：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。

$$\text{LAP (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} = \frac{1350.89 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

- ②按组织样本质量计算

单位定义：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。

$$\text{LAP (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times W \times T} = \frac{1350.89 \times \Delta A}{W}$$

- ③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 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。

$$\text{LAP (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times \text{细菌或细胞数量} \times T} = \frac{1350.89 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

- ④按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每分钟生成 1 nmol 的对硝基苯胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{LAP (U/mL)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times T} = 1350.89 \times \Delta A$$

3.2 使用微量玻璃比色皿测定的计算公式

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：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。

$$\text{LAP (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\varepsilon \times d_2 \times V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} = \frac{675.45 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：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。

$$\text{LAP (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\varepsilon \times d_2 \times V_{\text{样}} \times W \times T} = \frac{675.45 \times \Delta A}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 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。

$$\text{LAP (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\varepsilon \times d_2 \times V_{\text{样}} \times \text{细菌或细胞数量} \times T} = \frac{675.45 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每分钟生成 1 nmol 的对硝基苯胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{LAP (U/mL)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\varepsilon \times d_2 \times V_{\text{样}} \times T} = 675.45 \times \Delta A$$

注释： V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.01 mL；V 样总：粗酶液总体积，1 mL；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； d_1 ：96 孔板光径，0.5 cm； d_2 ：微量玻璃比色皿光径，1 cm；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计；T：反应时间，3 min； 10^9 ：单位换算系数，1 mol= 10^9 nmol。

四、注意事项

①若 ΔA 大于 0.5 时或 A 测定大于 1.5 时，建议将粗酶液使用试剂一适当稀释后再进行测定；若 ΔA 小于 0.02，建议适当增加样本量或延长酶促反应时间（37°C 反应时间可延长至 10-30 min）后再进行测定，计算时相应修改；

②准确在规定时间点完成吸光值测定，以确保实验结果的准确性和重复性；使用 96 孔板检测时应使用多道移液器且分批进行检测，以确保组间反应时间一致；

③为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

