

## 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。

自备用品：

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。

试剂的组成和配制：

提取液：液体100mL×1瓶，4℃保存；

试剂一：液体15mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×1瓶，-20℃保存；

样本的前处理：

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<sup>4</sup>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℃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℃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：

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。

$$\text{LAP (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 205.8 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$\text{LAP (nmol/min /104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (2000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.103 \times \Delta A$$

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。

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

(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。

$$\text{LAP (nmol/min /104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (2000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.206 \times \Delta A$$

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: 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。

---

[www.affandi-e.com](http://www.affandi-e.com)