

亮氨酸氨基肽酶（LAP）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AYHF8-M48	亮氨酸氨基肽酶（LAP）活性检测试剂盒	48T	微量法
AYHF8-M96		96T	

一、测定意义

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。

二、测定原理

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。

三、试剂组成

试剂名称	试剂装量（48T）	试剂装量（96T）	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	液体 120 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃避光保存
	使用前每瓶加入 1.5 mL 蒸馏水充分溶解，现配现用。		

四、操作步骤

一、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）：提取液体积（mL）为 1:（5-10）的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴匀浆，4℃ 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（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为（500-1000）：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴超声破碎细菌或细胞（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 10 s，重复 30 次），冰浴匀浆，4℃ 12000 g 离心 10 min，取上清于冰上待测。
- 3、血清（浆）等液体样本：直接检测或适当稀释后进行检测。

二、测定步骤

- 1、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 405nm，蒸馏水调零；
- 2、操作表（在 96 孔板中依次加入下列试剂）：

试剂名称	测定管	空白管
上清液 (μL)	10	-
提取液 (μL)	170	180
试剂一 (μL)	20	20
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；37℃准确反应 180 s (即 3min)，测定 210 s (总时间) 时 405 nm 处吸光值，记为 A2 测定和 A2 空白；计算 ΔA 测定=A2 测定-A1 测定，ΔA 空白=A2 空白-A1 空白，ΔA=ΔA 测定-ΔA 空白。 注：空白管只需测定 1-2 次。		

五、亮氨酸氨基肽酶 (LAP) 活性的计算：

1、按样本质量计算：

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。

$$\text{LAP(U/g)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9 \div (\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times W \times T) = 1125.75 \times \Delta A \div W$$

2、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。

$$\text{LAP (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T) = 1125.75 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

3、按细菌或细胞数量计算：

单位定义：每 10⁴ 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。

$$\text{LAP (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9 \div (\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times \text{细菌或细胞数量} \times T) = 1125.75 \times \Delta A \div \text{细菌或细胞数量}$$

4、按血清 (浆) 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。

$$\text{LAP (U/mL)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times T) = 1125.75 \times \Delta A$$

V 样：反应体系中加入上清液的体积，0.01 mL；V 样总：上清液总体积，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，9.87×10³ L/mol/cm；d：96 孔板光径，0.6cm；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；10⁹：单位换算系数，1 mol=10⁹ nmol。

六、注意事项：

1、如果 ΔA 大于 0.5 时或 A 测定大于 1.5 时，建议将粗酶液使用提取液适当稀释后再进行测定；如果 ΔA 小于 0.02，建议适当增加样本量或延长酶促反应时间 (37℃反应时间可延长至 10-30 min) 后再进行测定，计算公式注意修改；

- 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；
- 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。