

亮氨酸氨基肽酶（LAP）检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1083BKM

保存：4℃避光保存 12 个月

规格：48T/48S 96T/96S

适用样本：动物组织、细胞、血清（浆）、尿液等液体样本

产品简介

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特别是肝癌的发生和发展。本试剂盒提供了一种简单的检测方法检测生物样本中 LAP 的含量。其原理是 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。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
试剂一	60mL	120mL	4℃保存
试剂二	粉剂×1 支	粉剂×1 瓶	4℃保存

自备耗材

酶标仪或可见分光光度计（能测 405nm 处的吸光度）及恒温箱

96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头

低温离心机

DMSO、去离子水

匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

注意：小管试剂开盖前，请先低速离心。

试剂一：即用型；4℃保存。

试剂二：使用前，48T 加入 1.25mL DMSO；96T 加入 2.5mL DMSO，充分溶解。用不完的试剂，置于 4℃的条件下可保存一周，或分装后-20℃保存，避免反复冻融。

样本制备

动物组织：称取约 0.1g 样本，加入 1mL 试剂一，冰浴匀浆，8,000g，4℃离心 10min，取上清液置冰上待测。

细胞：收集 500 万细胞或细菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，离心后弃上清，加入 1mL 试剂一，冰浴超声波破碎细胞 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次）。然后 8,000g，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

液体样品：直接检测。

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用 BCA 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 405nm，可见分光光度计去离子水调零。
2. 取所需体积的试剂一置于 37℃预热 5min 以上。

产品说明书

3. 在 96 孔板或微量玻璃比色皿中依次加入 10 μ L 样本、170 μ L 试剂一和 20 μ L 试剂二；充分混匀后，立即记录 405nm 处初始吸光值 A_1 和 37 $^{\circ}$ C 孵育 2min 后的吸光值 A_2 ，计算 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

注意：1. 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果 ΔA 小于 0.001 可适当加大样本量；如果 ΔA 大于 0.5，样本可用试剂一进一步稀释，计算时结果乘以稀释倍数。

2. 测定反应的温度对测定结果有影响，请控制在 37 $^{\circ}$ C。

3. 因通过反应速率计算酶活，使用 96 孔板时请根据操作速度控制一次测定的样本数（通常一次测定 4-8 个样本），不推荐同时测多个样本。

结果计算

A. 使用 96 孔板测定的计算公式

1. 液体样本 LAP 活力计算

单位定义：每 mL 液体样本在反应体系中每分钟生成 1nmol 的对硝基苯胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{LAP (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 2026 \times \Delta A$$

2. 按样本鲜重计算

单位定义：每 g 组织在反应体系中每分钟生成 1nmol 的对硝基苯胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{LAP (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 2026 \times \Delta A \div W$$

3. 按细胞密度计算：

单位定义：每 1 万个细胞在反应体系中每分钟生成 1nmol 的对硝基苯胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{LAP (U/10}^4 \text{ Cells)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 4.05 \times \Delta A$$

4. 按样本蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟生成 1nmol 的对硝基苯胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{LAP (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 2026 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

ϵ ：对硝基苯胺摩尔消光系数， 9.87×10^3 L/mol/cm； $V_{\text{反应}}$ ：反应总体积， $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4}$ L； 10^9 ：1 mol = 1×10^9 nmol； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL； c_{pr} ：样本蛋白浓度，mg/mL； W ：样本鲜重，g； d ：96 孔板光径，0.5cm； T ：反应时间，2min；500：细菌或细胞总数，500 万。

B. 使用微量玻璃比色皿测定的计算公式

将上述计算公式中的光径 d :0.5cm 调整为 d :1cm 进行计算即可。

相关产品：

PMK1046BKM 脯氨酸（PRO）检测试剂盒（微量法）

PMK1084BKM 谷丙转氨酶（ALT/GPT）检测试剂盒（微量法）

PMK1085BKM 谷草转氨酶（AST/GOT）检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：

