

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 (10^4 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 $\Delta A = A2 - A1$ 。

注意事项: 若 ΔA 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。

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

(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。

$$\text{LAP (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (2000 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 0.103 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：对硝基苯胺摩尔消光系数， 9.72×10^3 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。

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

(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。

$$\text{LAP (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (2000 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 0.206 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：对硝基苯胺摩尔消光系数， 9.72×10^3 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。