

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号：E-BC-K568-M

产品规格：96T(80 samples)

检测仪器：酶标仪(405 nm)

Elabscience®亮氨酸氨基肽酶(LAP)比色法测试盒

Leucine Aminopeptidase (LAP) Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测动物组织样本及血清(浆)等液体样本的亮氨酸氨基肽酶活性。

检测原理

LAP 能催化底物 L-亮氨酸-4-硝基苯胺产生对硝基苯胺，后者在波长 405 nm 处有最大吸收峰，通过测定体系吸光度的增加值，即可计算 LAP 的酶活。

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格(Size) (96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extracting Solution)	60 mL × 2 瓶	2-8℃ 保存 12 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	粉剂 × 2 支	2-8℃ 避光 保存 12 个月
试剂三 (Reagent 3)	对硝基苯胺标准品 (p-Nitroaniline Standard)	粉剂 × 1 支	2-8℃ 避光 保存 12 个月
	96 孔酶标板	1 板	
	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(405 nm)

试剂：无水乙醇 (AR)

试剂准备

① 检测前，所有的试剂平衡至室温。

② 试剂二工作液配制：

每支试剂二粉剂用1.2 mL无水乙醇充分溶解，临用前配制，于冰盒上待用，2-8℃避光可保存7天。

③ 50 mmol/L对硝基苯胺标准品储备液的配制：

每支标准品粉剂用1 mL无水乙醇充分溶解得50 mmol/L对硝基苯胺标准品储备液。

④ 1 mmol/L对硝基苯胺标准品溶液的配制：

按50 mmol/L对硝基苯胺标准品储备液：试剂一体积比为1：49的比例稀释50倍，即得1 mmol/L标准品，临用前配制，于冰盒上待用，2-8℃避光可保存7天。

⑤ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mmol/L)	0	0.2	0.3	0.4	0.6	0.8	0.9	1.0
1 mmol/L 标准品(μL)	0	40	60	80	120	160	180	200
试剂一(μL)	200	160	140	120	80	40	20	0

样本准备

① 样本处理

血清(浆)样本：可直接测定。

组织样本：组织处理的匀浆介质为试剂一。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：5.2-201.8 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
人血清	不稀释	10%大鼠脾组织	不稀释
狗血清	不稀释	10%小鼠肝组织	不稀释
大鼠血清	不稀释	10%大鼠肾组织	不稀释
食蟹猴血清	不稀释	10%大鼠肺组织	不稀释

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

- ① 试剂一取用时应倒出部分，再取用，避免试剂污染。
- ② 样本加入板孔中时应触底加入。

操作步骤

- ① 取 10 μL 待测样本，加入到酶标板对应的测定孔中；
- ② 测定孔：向步骤①的测定孔中加入 170 μL 试剂一；
标准孔：向酶标板对应的标准孔中加入 180 μL 的试剂一；
- ③ 测定孔：取 20 μL 试剂二工作液加入到步骤②的测定孔中；
标准孔：取 20 μL 不同浓度标准品溶液加入到步骤②的标准孔中；
- ④ 酶标仪上振板 5 s，于波长 405 nm 处测定各孔 OD 值，记为 A_1 ，然后放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中，准确孵育 10 min，于波长 405 nm 处测定各孔 OD 值，记为 A_2 ，则 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

(注：标准孔不需要计算 ΔA 值，用孵育 10 min 后测定的 OD 值做标准曲线即可)

操作表

	标准孔	测定孔
待测样本(μL)	--	10
试剂一(μL)	180	170
不同浓度标准品(μL)	20	--
试剂二工作液(μL)	--	20
酶标仪上振板 5 s，于波长 405 nm 处测定各孔 OD 值，记为 A_1 ，然后放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中，准确孵育 10 min，于波长 405 nm 处测定各孔 OD 值，记为 A_2 ，则 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。		

注：标准孔不需要计算 ΔA 值，用孵育 10 min 后测定的 OD 值做标准曲线即可。

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

血清(浆)LAP活力的计算:

定义: 37°C条件下, 每升血清或血浆每分钟催化底物产生 1 μmol 的对硝基苯胺所需要的酶量为一个活力单位。

$$\text{LAP 活力 (U/L)} = (\Delta A - b) \div a \times V_1 \div V_2 \div T \times 1000^* \times f$$

组织中 LAP 活力的计算:

定义: 37°C条件下, 每克组织蛋白每分钟催化底物产生 1 μmol 的对硝基苯胺所需要的酶量为一个活力单位。

$$\text{LAP 活力 (U/gprot)} = (\Delta A - b) \div a \times V_1 \div V_2 \div T \times 1000^* \div C_{pr} \times f$$

注解:

y: 标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 的 OD 值)

x: 吸光度对应的浓度

a: 标准曲线斜率

b: 标准曲线截距

ΔA : 波长 405 nm 处测定孔的 OD 值变化($\Delta A = A_2 - A_1$)

V_1 : 加入试剂二工作液的体积: 20 μL

V_2 : 加入样本体积: 10 μL

1000*: 1 mmol = 1000 μmol

f: 加入检测体系前样本的稀释倍数

T: 反应时间: 10 min

C_{pr} : 加入检测体系前样本的蛋白浓度(gprot/L)

附录1 关键数据

1. 技术参数

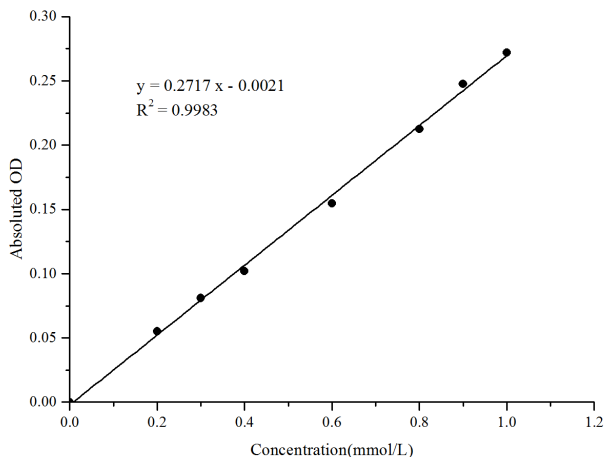
检测范围	5.2-201.8 U/L	平均批间差	6.4 %
灵敏度	5.2 U/L	平均批内差	4.1 %

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品加样量20 μL ，按照操作步骤进行实验，读取各点OD值如下表所示：

标准品浓度 (mmol/L)	0.0	0.2	0.3	0.4	0.6	0.8	0.9	1.0
OD 值	0.056	0.110	0.135	0.146	0.195	0.211	0.280	0.321
	0.056	0.112	0.139	0.170	0.226	0.326	0.327	0.335
平均 OD 值	0.056	0.111	0.137	0.158	0.211	0.269	0.304	0.328
绝对 OD 值	0.000	0.055	0.081	0.102	0.155	0.213	0.248	0.272

②制标准曲线，如下图所示：



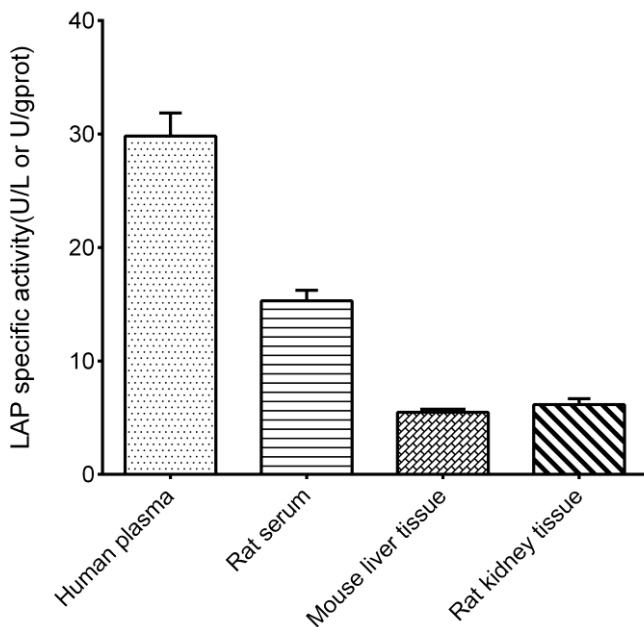
附录2 实例分析

例如检测人血清(数据仅供参考):

取10 μL 人血清加入到酶标板相应测定孔中,按操作表检测,结果如下:
对硝基苯胺标准曲线: $y = 0.4501x - 0.0181$,第一次测定时测定孔平均OD值为0.214,记为 A_1 ,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中孵育10 min后,测定孔平均OD值为0.240,记为 A_2 ,则 $\Delta A = A_2 - A_1 = 0.026$,计算结果为:

$$\text{LAP 活性} = (0.026 + 0.0181) \div 0.4501 \times 20 \div 10 \div 10 \times 1000 = 19.60 \text{ U/L (U/L)}$$

按照说明书,测定人血浆(加样量10 μL)、大鼠血清(加样量10 μL)、小鼠肝组织(10%匀浆蛋白浓度为7.31 gprot/L,加样量10 μL)和大鼠肾组织(10%匀浆蛋白浓度为4.52 gprot/L,加样量10 μL)中的LAP活性(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
测值不稳定，复孔差异大	加样时间过长	尽可能的缩短加样时间
样本测不出值	反应时间过短	可适当延长反应时间
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本，重新检测

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

附录4 客户发表文献

1. Zhang X, He C, Chen Y, et al. Cyclic reactions-mediated self-supply of H₂O₂ and O₂ for cooperative chemodynamic/starvation cancer therapy[J]. *Biomaterials*, 2021, 275:120987-. IF:12.479
2. Xia H, Scholtes C, Dufour CR, et al. Insulin action and resistance are dependent on a GSK3 β -FBXW7-ERR α transcriptional axis. *Nat Commun.* 2022; 13 (1):2105. IF:14.919
3. Liu Q, Zhang T X, Zheng Y D, et al. Calixarene-Embedded Nanoparticles for Interference-Free Gene-Drug Combination Cancer Therapy[J]. *Small*, 2021, 2006223. IF:11.459
4. He C, Zhang X, Chen C, et al. A solid lipid coated calcium peroxide nanocarrier enables combined cancer chemo/chemodynamic therapy with O₂/H₂O₂ self-sufficiency[J]. *Acta Biomaterialia*, 2021, 122. IF:8.203
5. Chen L, Tao F, Zhang Y, et al. Islet-cell autoantigen 69 accelerates liver regeneration by downregulating Tgfb1 and attenuating Tgf β signaling in mice[J]. *FEBS Letters*, 2020, 594(17). IF:6.665
6. Omar N, Frank J, Kruger J, et al. Effects of High Intakes of Fructose and Galactose, with or Without Added Fructooligosaccharides, on Metabolic Factors, Inflammation, and Gut Integrity in a Rat Model[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2021:2001133. IF:5.914
7. Wang C, Ma C, Fu K, et al. Phillygenin Attenuates Carbon Tetrachloride-Induced Liver Fibrosis via Modulating Inflammation and Gut Microbiota[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 9, 21. IF:5.81
8. Du Y Q, Zheng Y Z, Yu C X M, et al. The Mechanisms of Yu Ping Feng San in Tracking the Cisplatin-Resistance by Regulating ATP-Binding Cassette Transporter and Glutathione S-Transferase in Lung Cancer Cells[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021; 12: 678126. IF:5.81
9. Zeng X Peng, Wang L J, Guo L H, et al. Dasatinib ameliorates chronic pancreatitis induced by caerulein via anti- fibrotic and anti-inflammatory mechanism[J]. *Pharmacological Research*, 2019, 147, 104357. IF:5.574
10. Cao X, Liang Y, Liu R, et al. Uncovering the Pharmacological Mechanisms of Gexia-Zhuyu Formula (GXZY) in Treating Liver Cirrhosis by an Integrative Pharmacology Strategy. *Front Pharmacol.* 2022; 13:793888. IF:5.331
11. Wang Y, Xie W, Feng Y, et al. Epithelial-derived exosomes promote M2 macrophage

- polarization via Notch2/SOCS1 during mechanical ventilation. *Int J Mol Med.* 2022; 50 (1). IF:5.314
12. Jung D S, Son Y J, Shin J M, et al. Gymnaster Koraiensis Extract Alleviated Metabolic Syndrome Symptoms and Stimulated UCP1-Independent Energy Consumption via AMPK Activation in White Adipose Tissue[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2020. IF:5.309
 13. Ali A K, Komal A K, Almutairi S M, et al. Natural killer cell-derived IL-10 prevents liver damage during sustained murine cytomegalovirus infection[J]. *Frontiers in immunology*, 2019, 10: 2688. IF:5.085
 14. Xu Y , Zhang Y , Xu Y , et al. Activation of CD137 signaling promotes macrophage apoptosis dependent on p38 MAPK pathway-mediated mitochondrial fission[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2021 Jul;136:106003. IF:5.085
 15. Naseh A, Shirin B, Maryam M, et al. Attenuation of chronic arsenic neurotoxicity via melatonin in male offspring of maternal rats exposed to arsenic during conception: Involvement of oxidative DNA damage and inflammatory signaling cascades[J]. *Life Sciences* 266 (2021) 118876. IF:5.037
 16. Ahmed A E, Alshehri A, Al-Kahtani M A, et al. Vitamin E and selenium administration synergistically mitigates ivermectin and doramectin-induced testicular dysfunction in male Wistar albino rats[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 124: 109841. IF:4.545
 17. Su S, Tian H, Jia X, et al. Mechanistic insights into the effects of SREBP1c on hepatic stellate cell and liver fibrosis[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020. IF:4.486
 18. Wang L J, He L, Hao L, et al. Isoliquiritigenin ameliorates caerulein-induced chronic pancreatitis by inhibiting the activation of PSCs and pancreatic infiltration of macrophages[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020. IF:4.486
 19. Dejan Lazić, Andreas Scheurer, Dušan Čočić, et al. New bis-pyrazolopyridine ruthenium(III) complex as a potential anticancer drug: In vitro and in vivo activity in murine colon cancer[J]. *Dalton Transactions*, 2021 Jun; 50(22):7686-7704. IF:4.39
 20. Li X, Lv Z, Chen J, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* B10 can alleviate liver apoptosis and oxidative stress induced by aflatoxin B1[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2021, 151:112124. IF:4.06
 21. Amany Abdel-Rahman Mohamed , Safaa I. Khater , Ahmed Hamed Arisha , et al. Chitosan-stabilized selenium nanoparticles alleviate cardio-hepatic damage in type 2

- diabetes mellitus model via regulation of caspase, Bax/Bcl-2, and Fas/FasL-pathway[J]. *Gene*, 2020, 768(7):145288. IF:3.688
22. Zhang S, Jiang L, Hu H, et al. Pretreatment of exosomes derived from hUCMSCs with TNF- α ameliorates acute liver failure by inhibiting the activation of NLRP3 in macrophage[J]. *Life Sciences*, 2020, 246: 117401. IF:3.647
 23. Yu H, Zhang L, Chen P, et al. Dietary bile acids enhance growth, and alleviate hepatic fibrosis induced by a high starch diet via AKT/FOXO1 and cAMP/AMPK/SREBP1 pathway in *Micropterus salmoides*[J]. *Frontiers in Physiology*, 2019, 10. IF:3.367
 24. Sohini Sen, Shaunak Ghosh, Sayantan De, et al. Immunomodulatory and antimicrobial non-mulberry *Antheraea mylitta* silk fibroin accelerates in vitro fibroblast repair and regeneration by protecting oxidative stress[J]. *RSC Advances*, 2021 May; 11(31):19265-19282. IF:3.361
 25. Li Jianda, Yuan Chen, Liu Peng et al. Red blood cells serve as a vehicle for PEDV transmission.[J]. *Vet Microbiol*, 2021, 257: 109081. IF:3.293
 26. Chen L, Tao F, Zhang Y, et al. Islet-cell autoantigen 69 accelerates liver regeneration by downregulating Tgfb1 and attenuating Tgf β signaling in mice[J]. *FEBS Letters*, 2020. IF:3.057
 27. Cui Y, Wang Y, Liu G. Protective Effect of Barbaloin in a Rat Model of Myocardial Ischemia Reperfusion Injury Through the Regulation of the CNPY2?PERK Pathway[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2019. IF:2.928
 28. Sun Yan-Chun, Han Shi-Cheng, Yao Ming-Zhu, et al. High-throughput metabolomics method based on liquid chromatography-mass spectrometry: Insights into the underlying mechanisms of salinity-alkalinity exposure-induced metabolites changes in *Barbus capito*[J]. *Journal of Separation Science*, 2021 Jan; 44(2):497-512. IF:2.878
 29. Mustafa H N, Hegazy G A, El Awdan S A, et al. Liver ischemia/reperfusion injury, a setting in which the functional mass is reduced and the role of PDE5 inhibitor[J]. *Eur. J. Anat*, 2019, 23(5): 325-332. IF:2.638
 30. Chen L, Ma K, Fan H, et al. Exogenous hydrogen sulfide protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by inhibiting endoplasmic reticulum stress and cell apoptosis.[J]. *Spandidos Publications*, 2021(2). IF:2.447