

亮氨酸氨基肽酶（Leucine Aminopeptidase, LAP）试剂盒说明书

(分光法 48 样)

一、产品简介：

亮氨酸氨基肽酶（EC 3.4.11.1, LAP）是一种蛋白酶，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。

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即可得出 LAP 酶活性大小。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存条件	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	-20°C保存	临用前甩几下，使试剂落入底部，再加 4.5mL 乙醇溶解。用不完的试剂分装后-20°C保存，禁止反复冻融。
标准品	粉体 mg×1 支	4°C保存	若要重新做标曲则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、台式离心机、可调式移液器、天平、研钵、冰和蒸馏水。

四、亮氨酸氨基肽酶（LAP）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：

取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.5g），加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。4°C×12000rpm 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取

② 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；取约 500 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）；4°C×12000rpm 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照数量（10⁴）：提取液体积(mL)为 500-1000：1 的比例进行提取

③ 液体样本：若是澄清液体，直接检测，若液体样本浑浊，需 4°C×12000rpm，离心 10min，取上清液检测。

2、上机检测：

① 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 405nm，蒸馏水调零。

② 在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

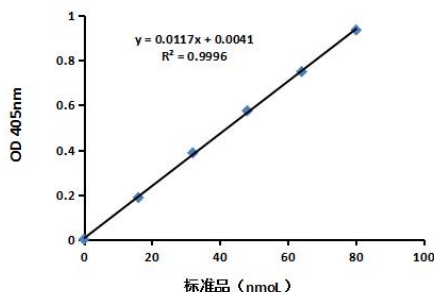
试剂名称 (μL)	测定管
试剂一	560
样本	160
试剂二	80
混匀, 立即于 405nm 处读取 A1 值, 37°C 反应 15min 后读取 A2 值。ΔA=A2-A1。	

【注】1. 加完试剂二即启动反应, 所以试剂二加完混匀后立即检测, 若 A2 值大于 1.5, 可减少样本加样量 V1 (如减至 40μL, 则试剂一相应增加), 或缩短反应时间 T (如由 15min 减至 5min), 则改变后的 V1 和 T 需代入公式重新计算。

2. 若 ΔA 小于 0.005, 可增大样本量 V1 (如增至 24μL, 试剂一相应减少), 或延长反应时间 T (如由 15min 增至 30min), 则改变后的 V1 和 T 需代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线: $y = 0.0117x + 0.0041$; x 为标准品 (对硝基苯胺) (nmol), y 为 ΔA。



2、按样本鲜重计算:

酶活定义: 每克组织每分钟催化产生 1nmol 对硝基苯胺定义为一个酶活单位 (U)。

$$\text{LAP (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A - 0.0041) \div 0.0117] \div (W \times V1 \div V) \div T = 35.6 \times (\Delta A - 0.0041) \div W$$

3、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1nmol 对硝基苯胺定义为一个酶活单位 (U)。

$$\text{LAP (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A - 0.0041) \div 0.0117] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 35.6 \times (\Delta A - 0.0041) \div \text{Cpr}$$

4、按细胞数量计算:

酶活定义: 每 10^4 个细胞每分钟催化产生 1nmol 对硝基苯胺定义为一个酶活单位 (U)。

$$\text{LAP (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A - 0.0041) \div 0.0117] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.07 \times (\Delta A - 0.0041)$$

5、按照液体体积计算:

酶活定义: 每毫升液体每分钟催化产生 1nmol 对硝基苯胺定义为一个酶活单位 (U)。

$$\text{LAP (nmol/min/mL)} = [(\Delta A - 0.0041) \div 0.0117] \div V1 \div T = 35.6 \times (\Delta A - 0.0041)$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.16mL;

T---反应时间, 15min;

W---样本质量, g;

500---细胞数量;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (50μmol/mL): 临用前甩几下或离心, 使粉体落入底部, 加入 0.5mL 乙醇, 涡旋震荡溶解后再加入 0.5mL 的蒸馏水混匀, 得到 50μmol/mL 备用。
- 2 用蒸馏水把母液稀释成以下浓度: 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5μmol/mL。也可根据实际来调整浓度。
- 3 160μL 标准品+640μL 试剂一, 混匀后于 405nm 处读取 A 值, 依据结果即可制作标准曲线。