

土壤亮氨酸氨基肽酶 (Solid-Leucine Aminopeptidase, S-LAP)

试剂盒说明书

(微板法 48 样)

一、产品简介:

土壤亮氨酸氨基肽酶 (LAP, EC 3.4.11.1) 是一类能水解肽链 N-末端为亮氨酸的酶, 由土壤微生物分泌。该酶活性变化与机体某些病理状态密切相关。

土壤亮氨酸氨基肽酶 (S-LAP) 分解 L-亮氨酸对硝基苯胺生成对硝基苯胺, 该物质在 405nm 有最大吸收峰, 通过测定吸光值升高速率来计算 S-LAP 活性。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存条件	备注
试剂一	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 mg×1 支	-20°C保存	临用前甩几下, 使试剂落入底部, 再加 2.7mL 乙醇混匀溶解。
试剂三	液体 35mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、恒温振荡培养箱/水浴锅、可调式移液器、天平。

四、土壤亮氨酸氨基肽酶 (S-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、样本处理:

取新鲜土样或干土 (风干或者 37 度烘箱风干), 先粗研磨, 过 40 目筛网备用。

【注】土壤风干, 减少土壤中水分对于实验的干扰; 土壤过筛, 保证取样的均匀细腻;

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 405nm。

② 在 EP 管中依次加入:

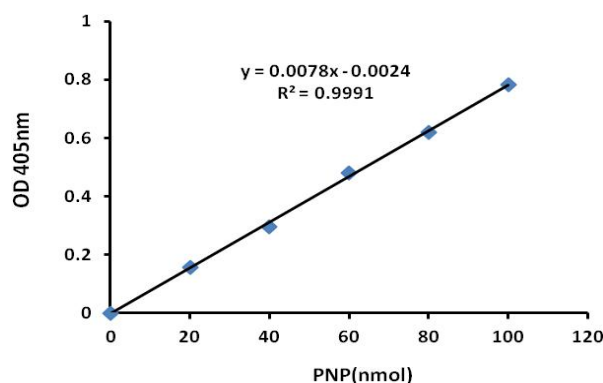
试剂名称 (μL)	测定管	对照管	空白管 (仅做一次)
土样 (g)	0.05	0.05	
试剂一	450	500	450
试剂二	50		50
充分混匀, 37°C培养 1 小时 (振荡培养或间隔 20min 手动振荡混匀几下)			
试剂三	300	300	300
混匀, 8000rpm 离心 5min (若上清液不澄清可加大离心力), 取 200μL 上清液至 96 孔板中, 405nm 下读取吸光值 A, $\Delta A = A_{测定} - A_{对照} - A_{空白}$ (每个样本做一个自身对照)。			

【注】: 1. 若 ΔA 较小, 可延长 37°C 的孵育时间 T (如增至 4 小时或更长), 或增加土样质量 W (如增至 0.2g)。则改变后的 T 和 W 需代入计算公式重新计算。

2. 若测定管 A 值大于 1.5 或 ΔA 大于 1.5, 可缩短 37°C 的孵育时间 T (如减至 0.5 小时或更短)。则改变后 T 需代入计算公式重新计算。或对最后一步的待检测上清液 (包括测定管、对照管和空白管) 同时用蒸馏水进行稀释, 稀释倍数 D 代入计算公式。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.0078x - 0.0024$ ；x 为标准品摩尔质量（nmol），y 为 ΔA 。



2、单位定义：每小时每克土样生成 1 nmol 对硝基苯胺定义为一个酶活力单位。

$$S-LAP(\text{nmol/h/g 土样}) = (\Delta A + 0.0024) \div 0.0078 \div W \div T \times D = 128.2 \times (\Delta A + 0.0024) \div W \times D$$

T---反应时间，1h；

W---土壤样本实际取样量，g。

D---稀释倍数，未稀释即为 1。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（50 $\mu\text{mol/mL}$ ）：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 50 $\mu\text{mol/mL}$ 备用。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成以下浓度：0,0.4,0.8,1.2,1.6, 2 $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 在 EP 管依次加入：50 μL 标准品+450 μL 试剂一+300 μL 试剂三，混匀，取 200 μL 至 96 孔板中，于 405nm 下读取吸光值，根据结果制作标准曲线。