

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

试剂盒说明书

（微板法 96 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 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 mg×2 支	-20℃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 70mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃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：

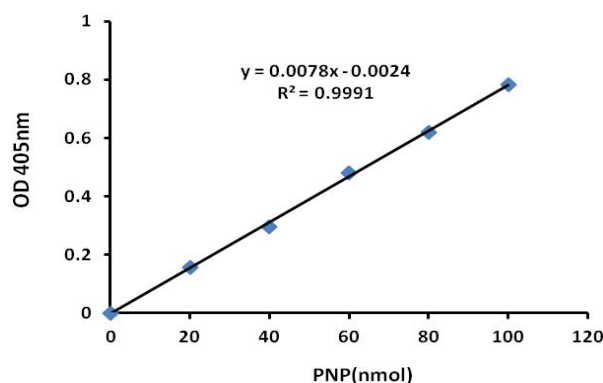
试剂名称（ μL ）	测定管	对照管	空白管（仅做一次）
土样（g）	0.05	0.05	
试剂一	450	500	450
试剂二	50		50
充分混匀，37℃培养 1 小时（振荡培养或间隔 20min 手动振荡混匀几下）			
试剂三	300	300	300
混匀，8000rpm 离心 5min（若上清液不澄清可加大离心力），取 200 μL 上清液至 96 孔板中，405nm 下读取吸光值 A， $\Delta A=A$ 测定-A 对照-A 空白（每个样本做一个自身对照）。			

【注】：1.若 ΔA 较小，可延长 37℃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℃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（10 $\mu\text{mol/mL}$ ）：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 10 $\mu\text{mol/mL}$ 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。