

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

(货号: ADS-W-AJS016 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	-20℃避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 2.2mL 乙醇溶解。用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融。
标准品	粉体 1 支	4℃避光保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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℃×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℃×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℃×12000rpm, 离心 10min, 取上清液检测。

2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 405nm。

② 在 96 孔板中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管
-----------	-----

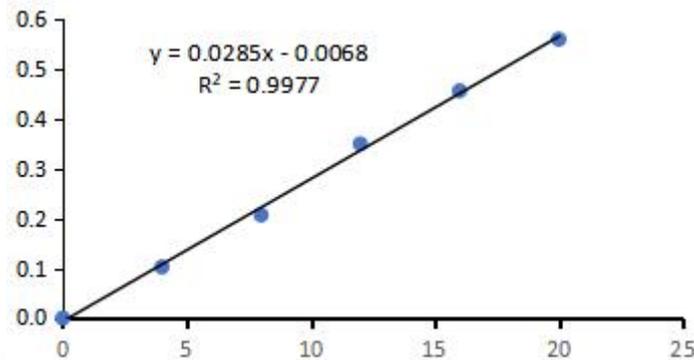
试剂一	140
样本	40
试剂二	20
混匀，于 405nm 处读取 A1 值，37°C 反应 15min 后读取 A2 值。ΔA=A2-A1。	

【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 10μL，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 80μL，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 = 0.0285x - 0.0068：x 为标准品（对硝基苯胺）(nmol)，y 为 ΔA。



2、按样本鲜重计算：

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

LAP (nmol/min/g 鲜重)=[(ΔA+0.0068)÷0.0285]÷(W×V1÷V)÷T=58.5×(ΔA+0.0068)÷W

3、按样本蛋白浓度计算：

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

LAP (nmol/min/mg prot)=[(ΔA+0.0068)÷0.0285]÷(V1×Cpr)÷T=58.5×(ΔA+0.0068)÷Cpr

4、按细胞数量计算：

单位定义：每 10⁴ 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)。

LAP (nmol/min/10⁴ cell)=[(ΔA+0.0068)÷0.0285]÷(500×V1÷V)÷T=0.117×(ΔA+0.0068)

5、按照液体体积计算：

单位定义：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)。

LAP (nmol/min/mL)=[(ΔA+0.0068)÷0.0285]÷V1÷T=58.5×(ΔA+0.0068)

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.04mL；

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 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，标准品母液浓度为 50μmol/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5μmol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 2 标品稀释参照表如下：

1. 吸取标准品母 100uL，加入 900uL 蒸馏水，混匀得到 5 μ mol/mL 的标品稀释液；
2. 吸取 5 μ mol/mL 的标品稀释液 100uL，加入 900uL 蒸馏水，混匀得到 0.5 μ mol/mL 的标品稀释液待用；

标品浓度 μ mol/mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μ L)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	40	
蒸馏水		40
试剂一	160	160
混匀后于 405nm 处读取 A 值， $\Delta A=A$ 测定-0 浓度管。		