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

(货号：G0422W 微板法 96 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-亮氨酰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 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×1 支	-20℃保存	临用前甩几下，使试剂落入底部，再加 2.2mL 乙醇溶解。用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、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℃×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（10^4）：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、上机检测：

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：

试剂名称（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℃反应 15min	

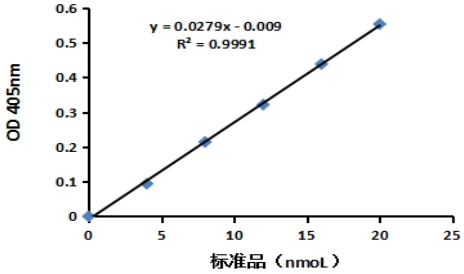
后读取 A2 值。ΔA=A2-A1。

【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 = 0.0279x - 0.009：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+0.009)÷0.0279]÷(W×V1÷V)÷T=59.7×(ΔA+0.009)÷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+0.009)÷0.0279]÷(V1×Cpr)÷T=59.7×(ΔA+0.009)÷Cpr

4、按细胞数量计算：

单位定义：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）。

LAP (nmoL/min/10^4 cell)=[(ΔA+0.009)÷0.0279]÷(500×V1÷V)÷T=0.12×(ΔA+0.009)

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+0.009)÷0.0279]÷V1÷T=59.7×(ΔA+0.009)

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 制备标准品母液（10μmol/mL）：临用前甩几下或离心，使粉体落入底部，加入 0.1mL 乙醇，涡旋震荡溶解后再加入 0.9mL 的蒸馏水混匀，得到 10μmol/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 40μL 标准品+160μL 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。