

Leucine aminopeptidase (LAP) Assay Kit

亮氨酸氨基肽酶(LAP)活性试剂盒说明书

货号: G0422W | 方法: 微板法 | 规格: 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 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。
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	若重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、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 (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、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:

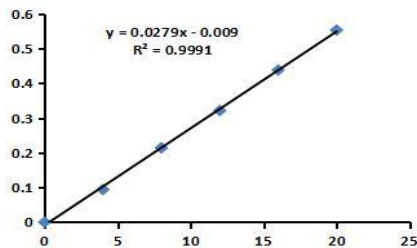
试剂名称 (μL)	测定管
试剂一	140

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

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；
针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

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。



标准曲线示意图

说明：标准曲线由标准品测定获得，具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

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）。

$LAP (nmol/min/g \text{ 鲜重}) = [(\Delta A + 0.009) \div 0.0279] \div (W \times V1 \div V) \div T = 59.7 \times (\Delta A + 0.009) \div W$

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）。

$LAP (nmol/min/mg \text{ prot}) = [(\Delta A + 0.009) \div 0.0279] \div (V1 \times Cpr) \div T = 59.7 \times (\Delta A + 0.009) \div Cpr$

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）。

$LAP (nmol/min/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.009) \div 0.0279] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.12 \times (\Delta A + 0.009)$

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）。

$LAP (nmol/min/mL) = [(\Delta A + 0.009) \div 0.0279] \div V1 \div T = 59.7 \times (\Delta A + 0.009)$

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。