

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

(货号: BN72337 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°C保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂×1 支	-20°C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°C保存, 禁止反复冻融。
标准品	粉体 mg×1 支	4°C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°C×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°C×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°C×12000rpm, 离心 10min, 取上清液检测。

2、上机检测:

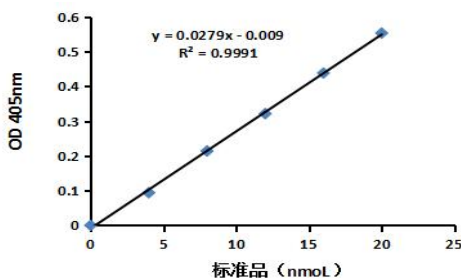
① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 405nm。

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。	

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)。

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

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)。

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

4、按细胞数量计算:

单位定义: 每 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)。

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

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)。

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

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。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (50μmol/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 50μmol/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。