



亮氨酸氨基肽酶(LAP)试剂盒

可见分光光度法

货号: R43906-48S

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。

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60mL×1瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体30mL×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4.5mL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。

所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径1cm)、台式离心机、可调式移液器、天平、研钵、冰和蒸馏水。

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:

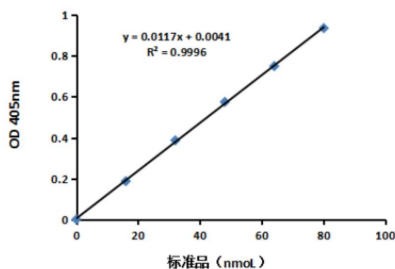
①可见分光光度计预热30min 以上, 调节波长至405nm, 蒸馏水调零。

② 在 1mL 玻璃比色皿(光径1cm) 中依次加入:

试剂名称(μL)	测定管
试剂一	560
样本	160
试剂二	80
混匀, 于405nm处读取A1值, 37℃反应15min后读取A2值。△A=A2-A1。	

结果计算:

1、标准曲线: $0.0117x + 0.0041$; x 为标准品(对硝基苯胺)(nmol), y为△A。





2、按样本鲜重计算:

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

$$\begin{aligned} \text{LAP}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A - 0.0041) \div 0.0117] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 35.6 \times (\Delta A - 0.0041) \div W \end{aligned}$$

3、按样本蛋白浓度计算:

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

$$\begin{aligned} \text{LAP}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A - 0.0041) \div 0.0117] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 35.6 \times (\Delta A - 0.0041) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算:

酶活定义: 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)。

$$\begin{aligned} \text{LAP}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) &= [(\Delta A - 0.0041) \div 0.0117] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 0.07 \times (\Delta A - 0.0041) \end{aligned}$$

5、按照液体体积计算:

酶活定义: 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)。

$$\begin{aligned} \text{LAP}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) &= [(\Delta A - 0.0041) \div 0.0117] \div V1 \div T \\ &= 35.6 \times (\Delta A - 0.0041) \end{aligned}$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入样本体积, 0.16mL;

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。



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 400-666-5481 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: 3008007435@qq.com

附：标准曲线制作过程：

- 1.制备标准品母液($50\mu\text{mol/mL}$): 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 $50\mu\text{mol/mL}$ 备用。
- 2.用蒸馏水把母液稀释成以下浓度: 0,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际来调整浓度。
3. 160 μL 标准品+640 μL 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。



源叶