CheKine™ 亮氨酸氨基肽酶（LAP）活性检测试剂盒（微量法）

货号: KTB4021　　规格: 48 T/48 S　96 T/96 S　　批号：见产品标签

	适用样本：动植物组织、细胞、细菌、血清（浆）
	保质期：4℃，避光保存 12 个月

01 背景与原理

亮氨酸氨基肽酶（LAP，EC 3.4.11.1）是一类能水解肽链 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。

本试剂盒检测原理是 LAP 分解 L-亮氨酸-4-硝基苯胺生成对硝基苯胺，后者在 405 nm 有最大吸收峰，通过测定吸光值升高速率来计算 LAP 活性。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Reagent Ⅰ	70 mL	70 mL×2	4℃
Reagent Ⅱ	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃，避光保存

***请在实验前检查各组分的量。**

***各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。**

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 405 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	PBS	样本清洗用
其他	匀浆器或研钵（组织样本）、水浴锅、离心机、超声破碎仪（细胞或细菌）、制冰机、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- **正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。**
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，**请在实验全程做好生物安全防护**，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Reagent Ⅰ	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Working Reagent Ⅱ	临用前配制；对于 48 T，临用前加入 9 mL Reagent Ⅰ；对于 96 T，临用前加入 18 mL Reagent Ⅰ；充分溶解待用(较难溶解时，可 60℃水浴加热约 30 min 促进溶解)	未用完的试剂-20℃分装避光保存一个月，禁止反复冻融；**Reagent Ⅱ有一定的刺激性，建议在使用过程中做好个人防护**

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本。样本尽量新鲜提取，如果不能当天提取，则把完整细胞或细菌、分装的组织块保存在-80℃，一个月内使用。

- **动植物组织：**称取约 0.1 g 组织，加入 1 mL Reagent Ⅰ进行冰浴匀浆，然后 8000 g，4℃离心 10 min，取上清置于冰上待测。
- **细胞或细菌：**收集 5×10^6 个细胞或细菌到离心管内，用预冷 PBS 清洗细胞，离心后弃上清，加入 1 mL Reagent Ⅰ，冰浴超声波破碎细胞或细菌 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），然后 8000 g，4℃离心 10 min，取上清液，置冰上待测。
- **血清（浆）**：直接检测。

05-3 实验步骤

1. **酶标仪准备**：预热 30 min 以上，调节波长到 405 nm。
2. **检测体系配制**：空白孔只需测定 1 次，在 96 孔板中按照如下方式操作：

试剂	测定孔（μL）	空白孔（μL）
样本上清	50	0
Reagent Ⅰ	0	50
Working Reagent Ⅱ	150	150

3. **吸光度检测**：充分混匀后，于 405 nm 处测定 30 s 时的吸光值 A_1，分别记为 $A_{1\,测定}$、$A_{1\,空白}$；迅速置于 37℃孵育 3 min，测定 405 nm 处 210 s 时的吸光值 A_2，分别记为 $A_{2\,测定}$、$A_{2\,空白}$。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧**二维码**或访问官网[https://www.abbkine.cn] **>** 进入“**技术中心**”**>** 查找“**在线计算器**”**工具**。

06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算$\Delta A_{测定}=A_{2\,测定}-A_{1\,测定}$，$\Delta A_{空白}=A_{2\,空白}-A_{1\,空白}$，$\Delta\Delta A=\Delta A_{测定}-\Delta A_{空白}$。

2. 样本 LAP 活性计算

- 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol 对硝基苯胺定义为一个酶活力单位。

$LAP(U/mg\ prot)=[\Delta\Delta A\times V_{反总}\div(\varepsilon\times d)\times 10^9]\div(V_{样}\times Cpr)\div T$**$=274.35\times\Delta\Delta A\div Cpr$**

- 按样本质量计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟生成 1 nmol 对硝基苯胺定义为一个酶活力单位。

$LAP(U/g)=[\Delta\Delta A\times V_{反总}\div(\varepsilon\times d)\times 10^9]\div(W\times V_{样}\div V_{样总})\div T$**$=274.35\times\Delta\Delta A\div W$**

- 按细胞数量计算

单位的定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol 对硝基苯胺定义为一个酶活力单位。

$LAP(U/10^4)=[\Delta\Delta A\times V_{反总}\div(\varepsilon\times d)\times 10^9]\div(N\times V_{样}\div V_{样总})\div T$**$=274.35\times\Delta\Delta A\div N$**

$V_{反总}$：反应体系总体积，2×10^{-4} L；ε：对硝基苯胺摩尔消光系数，9.72×10^3 L/mol/cm；d：96 孔板光径，0.5 cm；10^9：1 mol=1×10^9 nmol；$V_{样}$：加入样本体积，0.05 mL；$V_{样总}$：加入 Reagent Ⅰ体积，1 mL；T：反应时间，3 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；N：细胞或细菌总数，以 10^4 为单位（例如细胞数量为 5×10^6，N=500）。

07 结果展示

示例-1：取 0.1 g 小鼠肝脏样本，按照测定步骤操作，用 96 孔板进行检测。测得：$A_{1\,测定}=0.844$，$A_{2\,测定}=1.254$，$A_{1\,空白}=0.162$，$A_{2\,空白}=0.164$；$\Delta A_{测定}=A_{2\,测定}-A_{1\,测定}=0.41$，$\Delta A_{空白}=A_{2\,空白}-A_{1\,空白}=0.002$，$\Delta\Delta A=\Delta A_{测定}-\Delta A_{空白}=0.408$。按样本质量计算得：$LAP(U/g)=274.35\times\Delta\Delta A\div W=1119.348$ U/g。

08 FAQ

- **检测得到的样本ΔΔA 过高或者过低怎么办？**

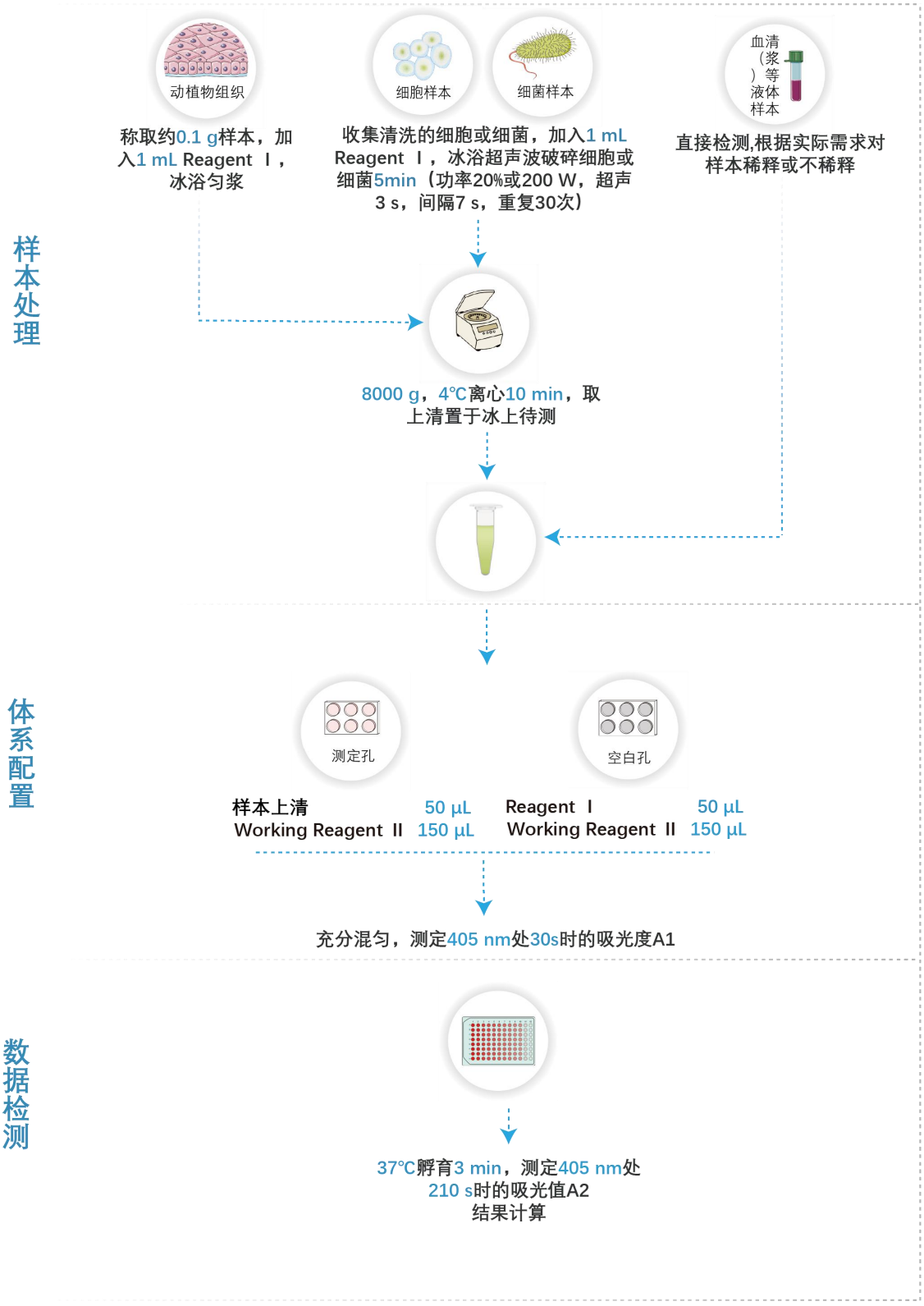
如果ΔΔA 小于 0.02 可适当加大样本量。如果ΔΔA 大于 0.5，样本可用 Reagent Ⅰ进一步稀释，或减少提取用样本量，再重新进行测定。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB4020	CheKine™ 土壤亮氨酸氨基肽酶（S-LAP）活性检测试剂盒（微量法）
KTB4010	CheKine™ 土壤硝酸还原酶（S-NR）活性检测试剂盒（微量法）

CheKine™亮氨酸氨基肽酶（LAP）活性检测流程示意图

（Abbkine 货号：KTB4021）



V1.0