

## 亮氨酸氨基肽酶（LAP）活性检测试剂盒说明书

| 产品货号      | 产品名称         | 包装规格 | 测定方法 |
|-----------|--------------|------|------|
| PMHF6-M48 | 亮氨酸氨基肽酶（LAP） | 48T  | 微量法  |
| PMHF6-M96 | 活性检测试剂盒      | 96T  |      |

### 一、测定意义：

亮氨酸氨基肽酶（LAP）是一种蛋白分解酶，能水解肽链 N 端并由亮氨酸与其他氨基酸形成肽键，参与组织蛋白和肽类的降解。揭示植物在蛋白质代谢，氮素循环及逆境响应值中的关键调控作用。

### 二、测定原理：

亮氨酸氨基肽酶可催化 L-亮氨酸对硝基苯胺生成对硝基苯胺，产物在 405 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可表征亮氨酸氨基肽酶的活性。

### 三、试剂组成：

| 试剂名称                                | 试剂装量(48T)   | 试剂装量(96T)    | 保存条件     |
|-------------------------------------|-------------|--------------|----------|
| 提取液                                 | 液体 60mL×1 瓶 | 液体 110mL×1 瓶 | 2-8℃保存   |
| 试剂一                                 | 液体 15mL×1 瓶 | 液体 25mL×1 瓶  | 2-8℃保存   |
| 试剂二                                 | 粉剂 ×1 瓶     | 粉剂 ×1 瓶      | 2-8℃避光保存 |
| 试剂二的配制：用时每瓶粉剂加入试剂一 3mL，混匀充分溶解，现配现用。 |             |              |          |

### 四、操作步骤：

#### 样本前处理

取一定量植物组织擦净水分及杂质，剪碎后放入研钵，加入液氮，研磨成粉状后转移出来，然后准确称重，按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），旋涡混匀抽提 3-5 分钟或者使用组织破碎仪冰浴提取，8000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

#### 测定步骤

1、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 405nm，蒸馏水调零。

2、操作表（在 96 孔板中加入以下试剂）：

| 试剂名称                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 测定管 | 空白管 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 样品（μL）                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 10  | -   |
| 试剂一（μL）                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 170 | 180 |
| 试剂二（μL）                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 20  | 20  |
| 充分混匀并立即开始计时，测定 30 s（总时间）时 405 nm 处吸光值，记为 A1 <sub>测定</sub> 和 A1 <sub>空白</sub> ；37℃准确反应 180 s（即 3min），测定 210 s（总时间）时 405 nm 处吸光值，记为 A2 <sub>测定</sub> 和 A2 <sub>空白</sub> ；计算 $\Delta A_{测定} = A2_{测定} - A1_{测定}$ ， $\Delta A_{空白} = A2_{空白} - A1_{空白}$ ， $\Delta A = \Delta A_{测定} - \Delta A_{空白}$ 。注：空白管只需测定 1-2 次。 |     |     |

### 五、亮氨酸氨基肽酶（LAP）活性计算：

1、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。

$$LAP(U/g) = \Delta A \times V_{反总} \times V_{样总} \times 10^9 \div (\epsilon \times d \times V_{样} \times W \times T) = 1125.75 \times \Delta A \div W$$

2、按蛋白浓度计算：

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。

$$LAP(U/mg \text{ prot}) = \Delta A \times V_{反总} \times 10^9 \div (\epsilon \times d \times V_{样} \times Cpr \times T) = 1125.75 \times \Delta A \div Cpr$$

$V_{样}$ ：反应体系中加入上清液的体积，0.01 mL； $V_{样总}$ ：上清液总体积，1 mL； $V_{反总}$ ：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：对硝基苯胺摩尔消光系数， $9.87 \times 10^3$  L/mol/cm；d：96 孔板光径，0.6cm；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；T：反应时间，3 min； $10^9$ ：单位换算系数，1 mol= $10^9$  nmol。

### 六、注意事项：

1、如果  $\Delta A$  大于 0.5 时或 A 测定大于 1.5 时，建议将粗酶液使用提取液适当稀释后再进行测定；如果  $\Delta A$  小于 0.02，建议适当增加样

本量或延长酶促反应时间（37℃反应时间可延长至 10-30 min）后

再进行测定，计算公式注意修改；

2、准确在规定时间点完成吸光值测定，以确保实验结果的准确性和重复性；

3、为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定。

#### 【厂家信息】

生产企业：南京陌凡生物科技有限公司

地址：南京市栖霞区红枫科技园 A6 栋 2 层

#### 【售后微信】



#### 【说明书核准及修改日期】

核准日期：2025 年 4 月 7 日

修改日期：2025 年 4 月 7 日