

土壤亮氨酸氨基肽酶 (Solid-Leucine Aminopeptidase, S-LAP)

试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

注意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

S-LAP 是一类能水解肽链 N-末端为亮氨酸的酶，由土壤微生物分泌。S-LAP 活性变化与机体某些病理状态密切相关。

测定原理：

S-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来计算 S-LAP 活性。

自备用品：

酶标仪/可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、96 孔板/微量石英比色皿和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

试剂一：液体 35mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃ 保存；

S-LAP 测定步骤：

- 1、 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 405nm，蒸馏水调零。
- 2、 在试剂二瓶中加入 15mL 试剂一充分溶解（如较难溶解，可 60℃ 水浴加热约 30min 促进溶解）；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融。
- 3、 操作表

试剂名称	对照管	测定管
新鲜土样 (g)	0.05	0.05
试剂一 (μL)	300	
试剂二 (μL)		300

混匀，37℃ 振荡反应 1h 后，8000g 4℃ 离心 10min，S-LAP 活力单位的计算：

取 200μL 上清液于微量石英比色皿或 96 孔板中，405nm 处测定吸光值 A，计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。每个测定管设一个对照管。

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下：

单位的定义：每天每 g 土样每天生成 1 μmol 对硝基苯胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{S-LAP } (\mu\text{mol/d/g 土样}) = \Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \div W \div T = 14.8 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积, 3×10^{-4} L; ϵ : 对硝基苯胺摩尔消光系数, 9.72×10^3 L / mol / cm; d: 比色皿光径, 1cm; T: 反应时间, 1h=1/24d; W: 样本质量, 0.05g。

b.用 96 孔板测定的计算公式如下:

单位的定义: 每天每 g 土样每天生成 1 μ mol 对硝基苯胺定义为一个酶活力单位。

$$S\text{-LAP} (\mu\text{mol/d/g 土样}) = \Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \div W \div T = 29.6 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积, 3×10^{-4} L; ϵ : 对硝基苯胺摩尔消光系数, 9.72×10^3 L / mol / cm; d: 比色皿光径, 0.5cm; T: 反应时间, 1h=1/24d; W: 样本质量, 0.05g。