

土壤亮氨酸氨基肽酶（S-LAP）试剂盒说明书

（货号:BP10100W-96 微板法 96 样 有效期: 6 个月）

一、指标介绍:

土壤亮氨酸氨基肽酶（LAP, EC 3.4.11.1）是一类能水解肽链 N-末端为亮氨酸的酶，由土壤微生物分泌。该酶活性变化与机体某些病理状态密切相关。

土壤亮氨酸氨基肽酶（S-LAP）分解 L-亮氨酸对硝基苯胺生成对硝基苯胺，该物质在 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。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 2 瓶	-20℃避光保存	每瓶： 1. 开盖前注意使试剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 2.7mL 乙醇混匀溶解； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 70mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂 1 支	4℃避光保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本处理:

取新鲜土样或干土（风干或者 37 度烘箱风干），先粗研磨，过 40 目筛网备用。

【注】土壤风干，减少土壤中水分对于实验的干扰；土壤过筛，保证取样的均匀细腻；

2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 405nm。

② 在 EP 管中依次加入：

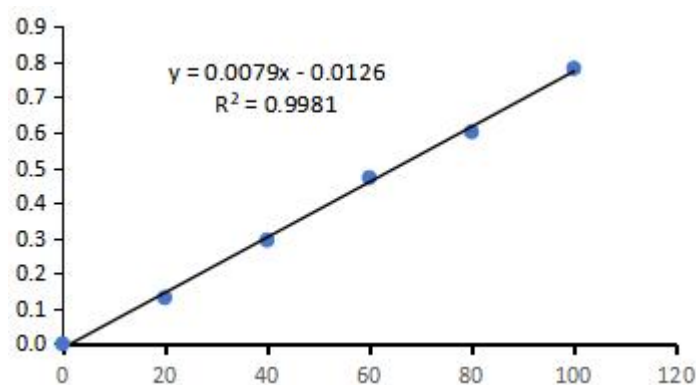
试剂组分 (μL)	测定管	对照管	空白管（仅做一次）
土样 (g)	0.05	0.05	
试剂一	450	500	450
试剂二	50		50

充分混匀，37℃培养 1 小时（振荡培养或间隔 20min 手动振荡混匀几下）			
试剂三	300	300	300
混匀，8000rpm 离心 5min（若上清液不澄清可加大离心力），取 200μL 上清液至 96 孔板中，405nm 下读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}$ （每个样本做一个自身对照）。			

- 【注】：1.若 ΔA 较小，可延长 37℃的孵育时间 T（如增至 4 小时或更长），或增加土样质量 W（如增至 0.2g）。则改变后的 T 和 W 需代入计算公式重新计算。
- 2.若测定管 A 值大于 1.5 或 ΔA 大于 1.5，可缩短 37℃的孵育时间 T（如减至 0.5 小时或更短）。则改变后 T 需代入计算公式重新计算。或对最后一步的待检测上清液（包括测定管、对照管和空白管）同时用蒸馏水进行稀释，稀释倍数 D 代入计算公式。

五、结果计算：

- 1、标准曲线方程： $y = 0.0079x - 0.0126$ ；x 为标准品摩尔质量（nmol），y 为 ΔA 。



- 2、单位定义：每小时每克土样生成 1 nmol 对硝基苯胺定义为一个酶活力单位。

$$S\text{-LAP}(\text{nmol/h/g 土样}) = (\Delta A + 0.0126) \div 0.0079 \div W \div T \times D = 126.6 \times (\Delta A + 0.0126) \div W \times D$$

T---反应时间，1h；

W---土壤样本实际取样量，g。

D---稀释倍数，未稀释即为 1。

附：标准曲线制作过程：

- 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，标准品母液浓度为 50μmol/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2μmol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 40uL，加入 960uL 蒸馏水，混匀得到 2μmol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μmol/mL	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	50	
蒸馏水		50
试剂一	450	450
试剂三	300	300
混匀，取 200μL 至 96 孔板中，于 405nm 下读取吸光值， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		