

亮氨酸脱氢酶(leucine dehydrogenase, LeuDH)试剂盒说明书

(货号: ADS-F-N027 紫外法 48 样)

一、产品简介:

亮氨酸脱氢酶(LeuDH, EC 1.4.1.9)是一种 NAD⁺依赖型的氧化还原酶,能够可逆地催化 L-亮氨酸和支链 L-氨基酸反应生成相应的 α -酮酸及其类似物。

本试剂盒利用亮氨酸脱氢酶(LeuDH)催化 2-酮丁酸和 NADH 生成氨基丁酸和 NAD⁺,通过检测 NADH 在 340nm 的下降速率,进而计算出亮氨酸脱氢酶(LeuDH)活性大小。

二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 2 支	-20°C保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部,再加 0.6mL 蒸馏水溶解,用不完的试剂分装后-20°C保存。
试剂二	粉剂 2 支	4°C保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部,每支再加 0.6mL 蒸馏水溶解,用不完的试剂分装后-20°C保存。
试剂三	粉剂 2 支	4°C保存	使用前甩几下使试剂落入底部,每支再加 0.6mL 蒸馏水溶解,4°C保存。
试剂四	液体 35mL×1 瓶	4°C保存	

三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿(光径 1cm)、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、亮氨酸脱氢酶(LeuDH)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 细菌/培养细胞:先收集细菌或细胞到离心管内,离心后弃上清;按照细菌或细胞数量 (10^4 个):建议 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);12000rpm,4°C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 个):提取液体积为 500~1000:1 的比例进行提取

- ② 液体样本:直接检测。若浑浊,离心后取上清检测。

2、上机检测:

- ① 紫外分光光度计预热 30min 以上,调节波长至 340nm,蒸馏水调零。
- ② 试剂解冻至室温 (25°C) 或于 25°C 水浴中孵育 10min;
- ③ 在 1mL 石英比色皿(光径 1cm)中按照下表依次加入试剂:

试剂名称 (μ L)	测定管
样本	40
试剂一	20
试剂二	20
试剂三	20
试剂四	620
混匀,立即于 340nm 处读取 A1,35°C 条件下孵育 10min 后读取 A2, $\Delta A = A1 - A2$ 。	

【注】:1. 若 ΔA 过小如小于 0.01,可增加样本体积 V1 (如增至 80 μ L,则试剂四相应减少),或延长反

应时间 T (如: 30min), 重新调整后 V1 和 T 需代入公式重新计算。

2. 若 ΔA 值大于 0.4, 需减少样本体积 V1 (如减至 10 μ L, 则试剂四相应增加), 或缩短反应时间 T (如: 2min 或更短), 重新调整后的样本体积 V1 和反应时间 T 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每分钟消耗 1nmol NADH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{LeuDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 289.4 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按细菌/细胞密度计算:

酶活定义: 每一万个细菌/细胞每分钟消耗 1 nmol NADH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{LeuDH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 289.4 \times \Delta A \div 500$$

3、按液体体积计算:

酶活定义: 每毫升液体样本每分钟消耗 1nmol NADH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{LeuDH 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T = 289.4 \times \Delta A$$

V1---加入样本体积, 0.04mL;

V---加入提取液体积, 1mL;

V2---反应体系总体积, 7.2 $\times 10^{-4}$ L;

d---光径, 1cm;

500---细菌或细胞总数, 万;

W---样本质量, g;

ϵ ---NADH 摩尔消光系数, 6.22 $\times 10^3$ L/mol/cm; T---反应时间, 10min;

Cpr---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。