

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

(货号: ADS-W-N027 微板法 96 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 100mL×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 20mL×1 瓶	4°C保存	

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、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 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm。
- ② 试剂解冻至室温 (25°C) 或于 25°C 水浴中孵育 10min;
- ③ 在 96 孔板中按照下表依次加入试剂:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	10
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	10
试剂四	160
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 40 μL , 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 5 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。

$$\text{LeuDH}(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 643.1 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{LeuDH}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 643.1 \times \Delta A \div 500$$

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。

$$\text{LeuDH 酶活}(\text{nmol/min/mL}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T = 643.1 \times \Delta A$$

V1---加入样本体积, 0.01mL;

V2---反应体系总体积, 2×10^{-4} L;

500---细菌或细胞总数, 万;

ϵ ---NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm;

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。

V---加入提取液体积, 1mL;

d---96 孔板光径, 0.5cm;

W---样本质量, g;

T---反应时间, 10min;