

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 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	粉剂 2 支	-20°C 避光保存	每支: 1. 临用前 8000g 4°C 离心 2min 使试剂落入管底(可手动甩一甩); 2. 每支加入 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	每支: 1. 临用前 8000g 4°C 离心 2min 使试剂落入管底(可手动甩一甩); 2. 每支加入 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	每支: 1. 临用前 8000g 4°C 离心 2min 使试剂落入管底(可手动甩一甩); 2. 每支加入 0.6mL 蒸馏水溶解, 4°C 保存。
试剂四	液体 20mL×1 瓶	4°C 保存	

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、样本提取:

- 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、检测步骤:

- 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:

试剂组分 (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 V_1 (如增至 40μL, 则试剂四相应减少), 或延长反应时间 T (如: 30min), 重新调整后 V_1 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 V_1 (如减至 5μL, 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 V_1 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。

$$\text{LeuDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_2] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T = 643.1 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{LeuDH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div W) \div T = 643.1 \times \Delta A \div 500$$

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。

$$\text{LeuDH 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_1 \div T = 643.1 \times \Delta A$$

V_1 ---加入样本体积, 0.01mL;

V ---加入提取液体积, 1mL;

V_2 ---反应体系总体积, 2×10^{-4} L;

d ---96 孔板光径, 0.5cm;

500---细菌或细胞总数, 万;

W ---样本质量, g;

ϵ ---NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 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。