



亮氨酸脱氢酶(LeuDH)活性测定试剂盒

紫外分光光度法

货号: R43920-48S

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。

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℃保存	
试剂一	液体0.6mL×2支	-20℃保存	用不完的试剂分装后-20℃保存。
试剂二	粉剂mg×2支	4℃保存	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℃保存
试剂三	粉剂mg×2支	4℃保存	用前甩几下使试剂落入底部, 每支再加0.6mL蒸馏水溶解, 4℃保存。
试剂四	液体35mL×1瓶	4℃保存	

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。

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℃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℃)或于25℃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(μL)	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℃条件下孵育10min后读取A2, $\Delta A = A1 - A2$ 。	

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。

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

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1nmol 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。

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

$$=289.4 \times \Delta A$$

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, 7.2×10^{-4} L;

d--- 光径, 1cm;

50---细菌或细胞总数, 万;

51-W---样本质量, g;

ϵ ---NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$;

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。

源叶