

Leucine dehydrogenase Assay Kit

亮氨酸脱氢酶(LeuDH)试剂盒说明书

货号: G0444W | 方法: 微板法 | 规格: 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℃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 20mL×1 瓶	4℃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℃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℃)或于 25℃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 (μ L)	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℃条件	

下孵育 10min 后读取 A2, $\Delta A = A1 - A2$ 。

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；
针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

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；

V---加入提取液体积，1mL；

V2---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，6.22×10³ 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。