亮氨酸脱氢酶(LeuDH)活性测定试剂盒（紫外分光光度法）

产品货号：BA2703

产品规格：48样

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。

产品内容：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体60mL×1瓶	2-8℃	
试剂一	液体0.6mL×2支	-20℃	用不完的试剂分装后-20℃保存。
试剂二	粉剂mg×2支	2-8℃	用前甩几下或离心使试剂落入底部，每支再加0.6mL蒸馏水充分溶解，用不完的试剂分装后-20℃保存。
试剂三	粉剂mg×2支	2-8℃	用前甩几下使试剂落入底部，每支再加0.6mL蒸馏水充分溶解，4℃保存。
试剂四	液体35mL×1瓶	2-8℃	

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

扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd
地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号
电话：400-611-0007 13671551480
Q Q：807961520
邮箱：saintbio@126.com
http://www.saint-bio.com

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，ΔA=A1-A2。	

【注】：1.若ΔA过小如小于0.01，可增加样本体积V1（如增至80μL，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10μL，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。

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。

   LeuDH(nmol/min/mg prot)=[ΔA÷(ε×d)×10^9×V2]÷(V1×Cpr)÷T=289.4×ΔA÷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。

   LeuDH(nmol/min/10^4cell)=[ΔA×V2÷(ε×d)×10^9]÷(500×V1÷V)÷T=289.4×ΔA÷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。

   LeuDH 酶活(nmol/min/mL)=[ΔA×V2÷(ε×d)×10^9÷V1÷T=289.4×ΔA

   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；500---细菌或细胞总数，万；W---样本质量，g；ε---NADH摩尔消光系数，6.22×10^3L/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。