



D-乳酸脱氢酶(D-LDH)活性检测试剂盒(可见分光光度法)

中文名称：**D-乳酸脱氢酶(D-LDH)活性检测试剂盒(可见分光光度法)**

英文名称：D-lactate Dehydrogenase(D-LDH)Activity Assay Kit

产品包装：盒装

产品规格：50T/24S

储存条件：-20℃

检测方法：可见分光光度法

有效期：6个月

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 30 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 20mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂三	液体 20mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 60mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1mL×1 支	2-8℃保存

溶液的配制：

1、试剂二：临用前加入 1.6 mL 蒸馏水，充分溶解。用不完的试剂分装保存，-20℃可保存 4 周，避免反复冻融。

2、标准品：20μmol/mL 丙酮酸钠溶液。

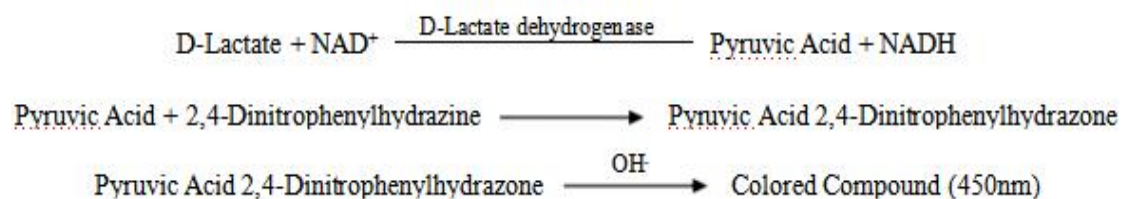
产品说明：

乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase ,LDH)广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，



是糖酵解途径的末端酶，催化丙酮酸与乳酸之间的可逆反应，伴随着 NAD^+/NADH 之间互变。根据其催化底物-乳酸构型的不同，可分为 D-乳酸脱氢酶(D-LDH , EC 1.1.1.28)与 L-乳酸脱氢酶(L-LDH , EC 1.1.1.27)。

D-LDH 催化 NAD^+ 氧化 D-乳酸生成丙酮酸，丙酮酸进一步与 2,4-二硝基苯肼作用生成丙酮酸二硝基苯腙，在碱性溶液中显棕红色，颜色深浅与丙酮酸浓度成正比。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、水浴锅/恒温培养箱、台式离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理

1. 细菌或培养细胞：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)：提取液体积(mL)为 500~1000: 1 的比例(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 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次)；8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
2. 组织：按照组织质量(g)：提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例(建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液)，进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
3. 血清(浆)等其他液体：直接检测。若有沉淀请离心后取上清待测。

二、测定步骤



- 1、可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 450nm，蒸馏水调零。
- 2、标准溶液的稀释：将 20 μ mol/mL 丙酮酸钠标准溶液用蒸馏水进行稀释得到 2、1.5、1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125 μ mol/mL 标准溶液备用。
- 3、加样表：(按顺序将下列试剂加在 EP 管中)

序号	稀释前浓度(μ mol/mL)	标准溶液体积(μ L)	蒸馏水体积(μ L)	稀释后浓度(μ mol/mL)
1	20	100	900	2
2	2	150	50	1.5
3	2	100	100	1
4	1	100	100	0.5
5	0.5	100	100	0.25
6	0.25	100	100	0.125
7	0.125	100	100	0.0625
8	0.0625	100	100	0.03125

备注： 实验中每个标准管需 50 μ L 标准溶液。

- 4、在 1.5mL EP 管按下表步骤加样

试剂名称(μ L)	测定管	对照管	标准管	空白管
待测样本	50	50	-	-
标准液	-	-	50	-
试剂一	250	250	250	250
试剂二	50	-	-	-
蒸馏水	-	50	50	100
充分混匀， 37 $^{\circ}$ C 水浴 15min				
试剂三	250	250	250	250
充分混匀， 37 $^{\circ}$ C 水浴 15min				
试剂四	750	750	750	750

充分混匀，室温静置 3min，取 1mL 转移至 1mL 玻璃比色皿中，450nm 下测定吸光度，
计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。空白管和标准曲线只需做 1-2

次，每个测定管需要设一个对照管。

三、D-LDH 活性计算

1. 标准曲线的绘制

根据标准管的浓度(x, $\mu\text{mol/mL}$)和吸光度 ΔA 标准(y, ΔA 标准),建立标准曲线。根据标准曲线, 将 ΔA 测定(y, ΔA 测定)带入公式计算样本浓度(x, $\mu\text{mol/mL}$)。

2. D-LDH 活性计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{D-LDH 活性(U/mg prot)} = x \times V_{\text{样}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 \times F = 66.67 \times x \div \text{Cpr} \times F$$

(2) 按样本质量计算

单位的定义: 每 g 组织每分钟催化产生 1nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{D-LDH 活性(U/g 质量)} = x \times V_{\text{样}} \div (W \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 \times F = 66.67 \times x \div W \times F$$

(3) 按细菌/细胞数量计算

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{D-LDH 活性(U/10}^4\text{cell)} = x \times V_{\text{样}} \div (N \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 \times F = 66.67 \times x \times F \div N$$

(4) 按血清(浆)等液体体积计算

单位的定义: 每 mL 血清(浆) 等液体每分钟催化产生 1nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{D-LDH 活性(U/mL)} = x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T \times 10^3 \times F = 66.67 \times x \times F$$

V 样: 反应体系中加入的样本体积, 0.05mL; V 样总: 加入的提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 15min; Cpr: 蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; N: 细胞或细菌数量, 以万计; 10^3 : 单位换算系数, $1\mu\text{mol/mL} = 10^3\text{nmol/mL}$; F: 样本稀释倍数。

注意事项:



1. 如果测定管吸光值接近空白或 ΔA 测定过低,可适当加大样本量后重新测定;如果测定管吸光值超过 1.5 或 ΔA 测定超过 0.4, 建议将样本用提取液适当稀释后进行测定。

注意同步修改计算公式。

实验实例:

1 、取 0.109g 兔肾加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆, 按照测定步骤操作, 用 1mL 玻璃比色皿测得计算 ΔA 测定 = A 测定 - A 对照 = 0.437 - 0.326 = 0.111, 带入标准曲线 $y = 0.6126x + 0.0162$, 计算 $x = 0.155$, 按样本质量计算酶活得:

$$D\text{-LDH 活性(U/g 质量)} = 66.67 \times x \div W \times F = 94.653 \text{ U/g 质量}$$

2 、取 0.1018g 拟南芥加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆, 按照测定步骤操作, 用 1mL 玻璃比色皿测得计算 ΔA 测定 = A 测定 - A 对照 = 0.256 - 0.207 = 0.049 , 带入标准曲线 $y = 0.6126x + 0.0162$, 计算 $x = 0.054$, 按样本质量计算酶活得: $D\text{-LDH 活性(U/g 质量)} = 66.67 \times x \div W \times F = 35.065 \text{ U/g 质量}$

3 、取 500 万细胞样本加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆, 按照测定步骤操作, 用 1mL 玻璃比色皿测得计算 ΔA 测定 = A 测定 - A 对照 = 0.249 - 0.195 = 0.054 , 带入标准曲线 $y = 0.6126x + 0.0162$, 计算 $x = 0.062$, 按细菌/细胞数目计算酶 活得:

$$D\text{-LDH 活性(U/10}^4 \text{ cell)} = 0.133 \times x \times F = 0.008 \text{ U/10}^4 \text{ cell}$$

4 、取 50 μ L 胎牛血清, 按照测定步骤操作, 用 1mL 玻璃比色皿测得计算 ΔA 测定 = A 测定 - A 对照 = 0.360 - 0.217 = 0.143 , 带入标准曲线 $y = 0.6126x + 0.0162$, 计算 $x = 0.207$, 按液体体积计算酶活得:

$$D\text{-LDH 活性(U/mL)} = 66.67 \times x \times F = 13.800 \text{ U/mL}$$