



L-乳酸脱氢酶(L-LDH)活性检测试剂盒(微量法)

中文名称：**L-乳酸脱氢酶(L-LDH)活性检测试剂盒(微量法)**

英文名称：Lacate Dehydrogenase(LDH) Activity Assay Kit

产品包装：盒装

产品规格：100T/48S

储存条件：-20℃

检测方法：微量法

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 60mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 7 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂三	液体 25mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8℃保存

溶液的配制：

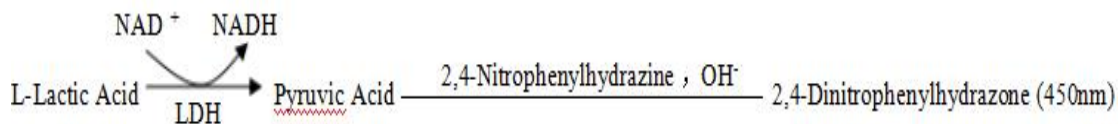
- 1、试剂二：临用时加入 1.3 mL 蒸馏水充分溶解备用，配好后可分装成小管-20℃保存，可保存 2 周，禁止反复冻融；
- 2、标准品：20μmol/mL 丙酮酸钠溶液。

产品说明：

L-LDH (EC 1.1.1.27)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 L-乳酸之间的可逆反应, 伴随着 NAD^+/NADH 之间互变。

L-LDH 催化 NAD^+ 氧化 L-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, 恒温水浴锅, 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°C 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°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

3、血清(浆)样本: 直接检测。若有浑浊离心后取上清测定即可。

二、测定步骤

1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 450nm, 分光光度计蒸馏水调零。

2、标准品的配制: 将 $20\mu\text{mol/mL}$ 标准品用蒸馏水稀释至 2、1、0.5、0.25、0.125、0



$\mu\text{mol/mL}$, 用 2、1、0.5、0.25、0.125、0 $\mu\text{mol/mL}$ 标准品做标准曲线。

3、标准品稀释可参考下表:

序号	稀释前浓度($\mu\text{mol/mL}$)	标准溶液体积(μL)	蒸馏水体积(μL)	稀释后浓度($\mu\text{mol/mL}$)
1	20	50	450	2
2	2	100	100	1
3	1	100	100	0.5
4	0.5	100	100	0.25
5	0.25	100	100	0.125
6	-	-	100	0

备注: 下述实验中每个标准管需 10 μL 标准品 (注意不要在此步骤直接检测标准品吸光度)。

4、样本测定

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	标准管
样本	10	10	-
标准品	-	-	10
试剂一	50	50	50
试剂二	10	-	-
蒸馏水	-	10	10
充分混匀, 37°C水浴 15min			
试剂三	50	50	50
充分混匀, 37°C水浴 15min			
试剂四	150	150	150
充分混匀, 常温静置 3min, 取 200 μL 转移至微量玻璃比色皿或在 96 孔板中, 450nm 下测定吸光度, 记为 A 测定管, A 对照管, A 标准管。计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。每个测定管需要设一个对照, 标准曲线只需做 1-2 次。			

三、L-LDH 活力单位计算

1. 根据标准管的浓度 ($x, \mu\text{mol/mL}$) 和吸光度 ΔA 标准 (y , 减去浓度为 0 的标准管吸光度), 建立标准曲线。根据标准曲线, 将 ΔA ($y, \Delta A$) 带入公式计算样本浓度 ($x, \mu\text{mol/mL}$)。

2. 血清(浆)L-LDH 活力的计算



单位的定义:每 mL 血清(浆)每分钟催化产生 1nmol 丙酮酸定义为一个酶活性单位。L-LDH

$$\text{活性(U/mL)} = x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T \times 10^3 = 66.7 \times x$$

3. 细胞,细菌和组织中 L-LDH 活力的计算

(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 1 nmol 丙酮酸定义为一个酶活性单位。

$$\text{L-LDH 活性(U/mg prot)} = x \times V_{\text{样}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 = 66.7 \times x \div \text{Cpr}$$

(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性单位。

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

(3) 按细菌或细胞计算:

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性单位。

$$\text{L-LDH 活性(U/10}^4\text{cell)} = x \times V_{\text{样}} \div (N \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 = 66.7 \times x \div N$$

V 样: 反应体系中加入的样本体积, 10 μ L=0.01mL; 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

总数, 以万计; 10³: 单位换算系数, 1 μ mol/mL= 10³nmol/mL。

注意事项:

1. ΔA 大于 1.3 或者小于 0.01 时, 建议将样本用蒸馏水稀释或者增大样本量进行实验, 注意同步修改计算公式。

实验实例:

1. 称取 0.103g 景天叶片, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 8000g, 4 $^{\circ}$ C离心 10min, 取上清置冰上待测。之后按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.275 - 0.199 = 0.076$, 带入标曲 $y = 0.5218x + 0.0063$, $R^2 = 0.9983$, 得 $x = 0.134 \mu\text{mol/mL}$,



计算乳酸脱氢酶活性得:

$$L\text{-LDH (U/g 质量)} = 66.67 \times x \div W = 86.74 \text{ U/g}$$

2. 称取 0.109 g 兔肝, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 8000g, 4°C离心 10min, 取上清用蒸馏水稀释 80 倍后置冰 上待测。之后按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算 $\Delta A = A$ 测定管 - A 对照管 = 0.795 - 0.132 = 0.663, 带入标曲 $y = 0.5218x + 0.0063$, $R^2 = 0.9983$, 得 $x = 1.259 \mu\text{mol/mL}$, 计算乳酸脱氢酶活性得:

$$L\text{-LDH (U/g 质量)} = 66.67 \times x \div W \times \text{稀释倍数} = 61605.53 \text{ U/g}$$

3. 取 10 μL 马血清之后按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算 $\Delta A = A$ 测定管 - A 对照管 = 0.415 - 0.161 = 0.254, 带入标曲 $y = 0.5218x + 0.0063$, $R^2 = 0.9983$, 得 $x = 0.475 \mu\text{mol/mL}$,

计算乳酸脱氢酶活性得:

$$L\text{-LDH(U/mL)} = 66.67 \times x = 31.67 \text{ U/mL}$$