

D-乳酸脱氢酶(D-LDH)活性检测试剂盒

中文名称： D-乳酸脱氢酶(D-LDH)活性检测试剂盒

英文名称： D-lactate Dehydrogenase(D-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

产品简介： 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。

产品组成：

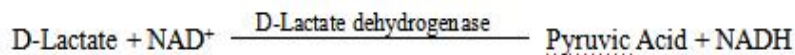
试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 7mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂三	液体 7mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 20mL×1 瓶	2-8℃保存

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 0.8 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。



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(可适当调整待测样本量)**

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/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 450nm, 分光光度计蒸馏水调零。

2,标准溶液的稀释: 将 20 $\mu\text{mol/mL}$ 丙酮酸钠标准溶液用蒸馏水进行稀释得到 2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.015625、0.0078125 $\mu\text{mol/mL}$ 标准溶液备用。

3、标准溶液稀释可参考下表:

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	100	900	2
2	2	150	100	1
3	1	100	100	0.5
4	0.5	100	100	0.25
5	0.25	100	100	0.125
6	0.125	100	100	0.0625
7	0.0625	100	100	0.03125
8	0.03125	100	100	0.015625
9	0.015625	100	100	0.0078125

备注: 实验中每个标准管需 50 μL 标准溶液。

4、在 1.5mLEP 管/96 孔板按下表步骤加样

试剂名称(μL)	测定管	对照管	标准管	空白管
待测样本	10	10	-	-
标准液	-	-	10	-
试剂一	50	50	50	50
试剂二	10	-	-	-
蒸馏水	-	10	10	20
充分混匀, 37°C水浴 15min				
试剂三	50	50	50	50
充分混匀, 37°C水浴 15min				
试剂四	150	150	150	150

充分混匀, 室温静置 3min, 取 200 μL 转移至微量玻璃比色皿或 96 孔板中, 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 $\Delta A_{\text{标准}}$ ($y, \Delta A_{\text{标准}}$)，建立标准曲线。根据标准曲线，将 $\Delta A_{\text{测定}}$ ($y, \Delta A_{\text{测定}}$) 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。

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

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

$V_{\text{样}}$ ：反应体系中加入的样本体积，0.01mL； $V_{\text{样总}}$ ：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 96 孔板测得计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照=0.425-0.298=0.127,带入标准曲线 $y=0.5379x+0.0087$, 计算 $x=0.220$,按样本质量计算酶活得:

$$D-LDH \text{ 活性 (U/g 质量)} = 66.67 \times x \div W \times F = 134.520 \text{ U/g 质量}$$

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 96 孔板测得计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照=0.236-0.196=0.04,带入标准曲线 $y=0.5379x+0.0087$, 计算 $x=0.058$,按样本质量计算酶活得:

$$D-LDH \text{ 活性(U/g 质量)} = 66.67 \times x \div W \times F = 38.109 \text{ U/g 质量}$$

3、取 500 万细胞加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆,按照测定步骤操作,用 96 孔板测得计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照=0.225-0.174=0.051,带入标准曲线 $y=0.5379x+0.0087$, 计算 $x=0.079$,按细菌/细胞数目计算酶活得:

$$D-LDH \text{ 活性 (U/10}^4\text{cell)} = 0.133 \times x \times F = 0.010 \text{ U/10}^4 \text{ cell}$$

4、取 10 μ L 胎牛血清,按照测定步骤操作,用 96 孔板测得计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照=0.322-0.201=0.121,带入标准曲线 $y=0.5379x+0.0087$, 计算 $x=0.209$,按液体体积计算酶活得:

$$D-LDH \text{ 活性(U/mL)} = 66.67 \times x \times F = 13.919 \text{ U/mL}$$