

## 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：50T/24S

储存条件：-20°C

检测方法：可见分光光度法

有效期：6个月

产品组成：

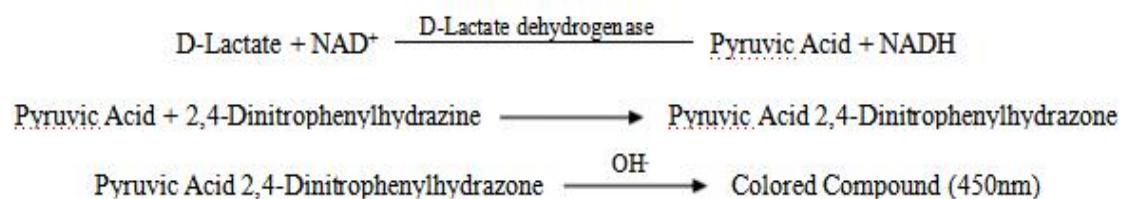
试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 30 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 20mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂三	液体 20mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂四	液体 60mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	液体 1mL×1 支	2-8°C保存

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°C可保存 4 周，避免反复冻融；
- 2、标准品：20μmol/mL 丙酮酸钠溶液。

产品简介：乳酸脱氢酶 (Lactate dehydrogenase, LDH) 广泛存在于动物、植物、微生物

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<sup>+</sup>/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<sup>+</sup>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(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<sup>4</sup>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 $\mu\text{mol}/\text{mL}$  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 $\mu\text{mol}/\text{mL}$  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( $\mu\text{mol}/\text{mL}$ )	标准溶液体积( $\mu\text{L}$ )	蒸馏水体积( $\mu\text{L}$ )	稀释后浓度( $\mu\text{mol}/\text{mL}$ )
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 $\mu\text{L}$  标准溶液。

- 4、在 1.5mL EP 管按下表步骤加样

试剂名称( $\mu\text{L}$ )	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 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15min				
试剂三	250	250	250	250
充分混匀， 37 $^{\circ}\text{C}$ 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  $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{对照}$ ,  $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白}$ 。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  $\Delta A_{标准}$  ( $y, \Delta A_{标准}$ ), 建立标准曲线。根据标准曲线, 将  $\Delta A_{测定}$  ( $y, \Delta A_{测定}$ ) 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。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, 0.05mL;  $V_{\text{样总}}$ : 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,  $1\mu\text{mol}/\text{mL}=10^3\text{nmol}/\text{mL}$ ; 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 $\Delta A$ 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 $\Delta A$ 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  $\Delta A$  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:

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

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  $\Delta A$  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-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  $\Delta A$  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:

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

4、取 50 $\mu\text{L}$  胎牛血清, 按照测定步骤操作, 用 1mL 玻璃比色皿测得计算  $\Delta A$  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:

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

mlbio 酶联生物  
Good elisakit producers