



## L-乳酸脱氢酶(L-LDH)活性检测试剂盒(微量法)

中文名称：**乳酸脱氢酶(LDH)活性检测试剂盒**

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 7mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 25mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8℃保存

溶液的配制：

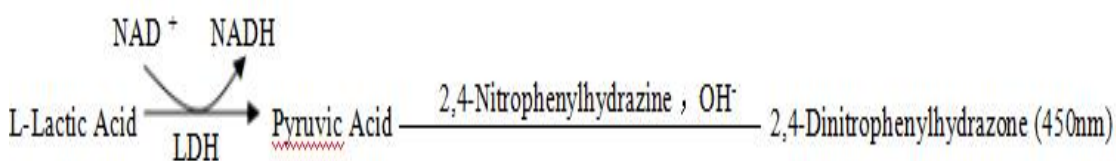
- 1、试剂二：临用时加入 1.3 mL 蒸馏水充分溶解备用，配好后可分装成小管-20℃保存，可保存 2 周，禁止反复冻融；
- 2、标准品：20μmol/mL 丙酮酸钠溶液。



### 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<sup>+</sup>/NADH 之间互变。

L-LDH 催化 NAD<sup>+</sup>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<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)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 $\mu$ mol/mL 标准品用蒸馏水稀释至 2、1、0.5、0.25、0.125、0  $\mu$ mol/mL，用 2、1、0.5、0.25、0.125、0 $\mu$ 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( $\mu$ mol/mL)	标准溶液体积( $\mu$ L)	蒸馏水体积( $\mu$ L)	稀释后浓度( $\mu$ 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 $\mu$ L 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 ( $\mu$ L)	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 $^{\circ}$ C准确水浴 15min			
试剂三	50	50	50
充分混匀，37 $^{\circ}$ C水浴 15min			
试剂四	150	150	150
充分混匀，常温静置 3min，取 200 $\mu$ L 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 $\Delta A = A$ 测定管 - A 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  $\Delta A$  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  $\Delta A$  ( $y, \Delta A$ ) 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。

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

$V_{\text{样}}$ : 反应体系中加入的样本体积,  $10\mu\text{L}=0.01\text{mL}$ ;  $V_{\text{样总}}$ : 加入的提取液体积, 1mL;

$T$ : 反应时间, 15min;  $\text{Cpr}$ : 蛋白质浓度, mg/mL;  $W$ : 样本质量, g;  $N$ : 细胞或细菌

总数, 以万计;  $10^3$ : 单位换算系数,  $1\mu\text{mol/mL}=10^3\text{nmol/mL}$ 。

#### 注意事项:

1.  $\Delta A$  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℃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：

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

2. 称取 0.109 g 兔肝，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，8000g，4℃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 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.795 - 0.132 = 0.663$ ，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：

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

3. 取 10 $\mu\text{L}$  马血清之后按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.415 - 0.161 = 0.254$ ，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：

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