

D-乳酸脱氢酶（D-LDH）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：AC17833

规格：100T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×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 7 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8℃保存

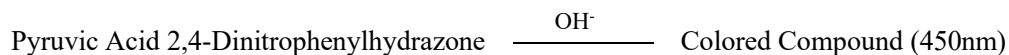
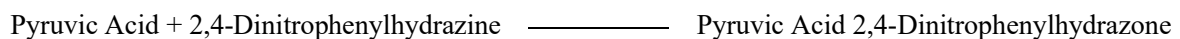
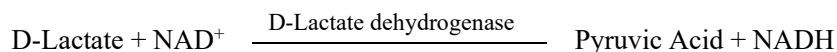
溶液的配制：

- 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：20 μmol/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/酶标仪、水浴锅/恒温培养箱、台式离心机、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、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，具体比例可以参考文献）

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）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 μ 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 μ 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 (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	100	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10 μ L标准溶液。

- 4、在1.5mLEP管/96孔板按下表步骤加样

试剂名称(μ L)	测定管	对照管	标准管	空白管
待测样本	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 μ L 转移至微量玻璃比色皿或 96 孔板中，450nm 下测定吸光度，计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照， ΔA 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 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。

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

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

(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。

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

V样: 反应体系中加入的样本体积, 0.01mL; 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:

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

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:

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

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:

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

4、取10 μL 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:

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

参考文献:

[1] Huang P H, Fu L C, Huang C S, et al. The uptake of oligogalacturonide and its effect on growth inhibition, lactate dehydrogenase activity and galactin-3 release of human cancer cells[J]. Food chemistry, 2012, 132(4): 1987-1995.

[2] Huang Y N, Xu G T, You C P. The research progress of the lactate dehydrogenases in lactic acid bacteria[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, (08): 369-373.

相关系列产品:

- AC10162/AC10163 丙酮酸激酶 (PK) 活性检测试剂盒
- AC10186/AC10187 乳酸脱氢酶 (LDH) 活性检测试剂盒
- AC10198/AC10199 己糖激酶 (HK) 活性检测试剂盒
- AC10410/AC10411 3-磷酸甘油酸激酶 (PGK) 活性检测试剂盒
- AC10414/AC10415 果糖-1,6-二磷酸醛缩酶 (FBA) 活性检测试剂盒