

## L-乳酸脱氢酶活性检测试剂盒(微量法)

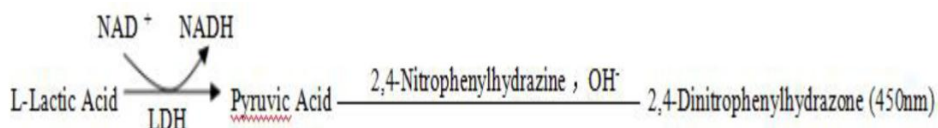
产品货号: BA3179

产品规格: 100T/48S

### 产品简介:

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。

### 试剂盒组分与配制:

| 试剂名称 | 规格        | 保存要求 |
|------|-----------|------|
| 提取液  | 液体60mL×1瓶 | 2-8℃ |
| 试剂一  | 液体7mL×1瓶  | 2-8℃ |
| 试剂二  | 粉剂×1支     | -20℃ |
| 试剂三  | 液体7mL×1瓶  | 2-8℃ |
| 试剂四  | 液体25mL×1瓶 | 2-8℃ |
| 标准品  | 液体1mL×1支  | 2-8℃ |

溶液的配制:

1. 试剂二: 临用时加入1.3mL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。

### 所需仪器和用品:

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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

## 二、测定步骤

- 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。
- 标准品的配制：将20μmol/mL标准品用蒸馏水稀释至2、1、0.5、0.25、0.125、0μmol/mL，用2、1、0.5、0.25、0.125、0μmol/mL标准品做标准曲线。
- 标准品稀释可参考下表

| 序号 | 稀释前浓度(μmol/mL) | 标准溶液体积(μL) | 蒸馏水体积(μL) | 稀释后浓度(μmol/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10μL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准确水浴15min                                                                                                                             |     |     |     |
| 试剂三                                                                                                                                             | 50  | 50  | 50  |
| 充分混匀， 37°C水浴                                                                                                                                    |     |     |     |
| 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

- 根据标准管的浓度（x, μmol/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, ΔA）带入公式计算样本浓度（x, μmol/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。

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

### 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1nmol丙酮酸定义为一个酶活性单位。

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

#### （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。

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

#### （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。

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

V样：反应体系中加入的样本体积，10μL=0.01mL；V样总：加入的提取液体积，1mL；T：反应时间，15min；



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

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°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:  
$$\text{L-LDH (U/g 质量)} = 66.67 \times x \div W = 86.74 \text{ U/g}$$
2. 称取0.109g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 $\Delta A=A_{\text{测定管}}-A_{\text{对照管}}=0.795-0.132=0.663$ , 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:  
$$\text{L-LDH (U/mL)} = 66.67 \times x = 31.67 \text{ U/mL}$$



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com