

L-乳酸脱氢酶活性检测试剂盒(微量法)

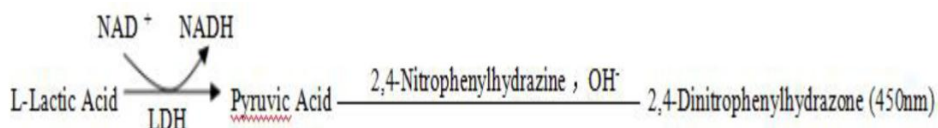
产品货号: BA3179

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⁺/NADH之间互变。

L-LDH催化NAD⁺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(10⁴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。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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 μ mol/mL标准品用蒸馏水稀释至2、1、0.5、0.25、0.125、0 μ mol/mL，用2、1、0.5、0.25、0.125、0 μ 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(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	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 μ 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 (μ 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°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 μ 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 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。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

1. 根据标准管的浓度（ x , μ mol/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 , μ 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。

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

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。

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

（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。

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

（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。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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

V样：反应体系中加入的样本体积，10 μ L=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：细胞或细菌总数，以万计；10³：单位换算系数，1 μ mol/mL=10³nmol/mL。

注意事项：

1. ΔA 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：
 $L\text{-LDH (U/g 质量)} = 66.67 \times x \div W = 86.74 \text{ U/g}$
2. 称取0.109g兔肝，加入1mL提取液，进行冰浴匀浆，8000g，4℃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：
 $L\text{-LDH (U/g 质量)} = 66.67 \times x \div W \times \text{稀释倍数} = 61605.53 \text{ U/g}$
3. 取10 μ 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：
 $L\text{-LDH (U/mL)} = 66.67 \times x = 31.67 \text{ U/mL}$ 。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>