

D-乳酸脱氢酶(D-LDH)活性检测试剂盒(微量法)

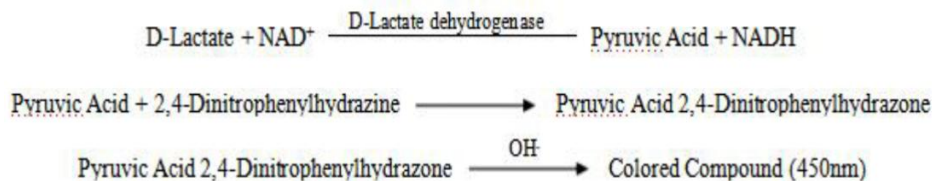
产品货号: BA3177

产品规格: 100T/48S

产品简介:

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。

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20mL×1瓶	2-8℃
标准品	液体1mL×1支	2-8℃

溶液的配制:

1. 试剂二: 临用前加入0.8mL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。

所需仪器和用品:

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

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),



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

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

- 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。
- 标准品的配制：将20μmol/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、0.0078125μmol/mL标准溶液。
- 标准溶液稀释可参考下表：

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	100	900	2
2	2	150	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50μL标准溶液。

4. 在1.5mL EP管/96孔板按下表步骤加样：

试剂名称 (μL)	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	10
充分混匀，37℃准确水浴15min				
试剂三	50	50	50	50
充分混匀，37℃水浴15min				
试剂四	150	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，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活力单位计算

1. 标准曲线的绘制

根据标准管的浓度（x，μmol/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，μmol/mL）。

2. D-LDH单位的定义：

（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。

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

（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性单位。

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



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) 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。

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

(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。

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

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, $1\mu\text{mol/mL} = 10^3\text{nmol/mL}$;

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 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.425 - 0.298 = 0.127$, 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:
 $\text{D-LDH活性(U/g质量)} = 66.67 \times x \div W \times F = 134.520\text{U/g质量}$
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 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.236 - 0.196 = 0.04$, 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:
 $\text{D-LDH活性(U/g质量)} = 66.67 \times x \div W \times F = 38.109\text{U/g质量}$
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 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.225 - 0.174 = 0.051$, 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 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.322 - 0.201 = 0.121$, 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:
 $\text{D-LDH活性(U/mL)} = 66.67 \times x \times F = 13.919$



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>