

D-乳酸脱氢酶(D-LDH)活性检测试剂盒(可见分光光度法)

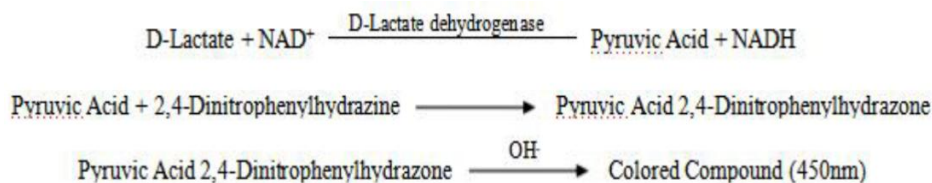
产品货号: BA3176

产品规格: 50T/24S

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30mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体20mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×1支	-20℃
试剂三	液体20mL×1瓶	2-8℃
试剂四	液体60mL×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1.6mL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

1. 分光光度计预热30min以上，调节波长至450nm，蒸馏水调零。
2. 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、1.5、1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125μmol/mL标准溶液。
3. 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	50	1.5
3	2	100	100	1
4	1	100	100	0.5
5	0.5	100	100	0.25
6	0.25	100	100	0.125
7	0.125	100	100	0.0625
8	0.0625	100	100	0.03125

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	50	50	-	-
标准液	-	-	50	-
试剂一	250	250	250	250
试剂二	50	-	-	-
蒸馏水	-	50	50	100
充分混匀，37℃准确水浴15min				
试剂三	250	250	250	250
充分混匀，37℃水浴15min				
试剂四	750	750	750	750
充分混匀，室温静置3min，取1mL转移至1mL玻璃比色皿中，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。

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

（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。

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

（3）按细菌或细胞计算：



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

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。

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

(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。

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

V样：反应体系中加入的样本体积，0.05mL；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。

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1mL玻璃比色皿测得计算 $\Delta A_{\text{测定}}=A_{\text{测定}}-A_{\text{对照}}=0.437-0.326=0.111$ ，带入标准曲线 $y=0.6126x+0.0162$ ，计算 $x=0.155$ ，按样本质量计算酶活得：
 $D-LDH\text{活性}(U/g\text{质量})=66.67 \times x \div W \times F = 94.653 U/g\text{质量}$
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1mL玻璃比色皿测得计算 $\Delta A_{\text{测定}}=A_{\text{测定}}-A_{\text{对照}}=0.256-0.207=0.049$ ，带入标准曲线 $y=0.6126x+0.0162$ ，计算 $x=0.054$ ，按样本质量计算酶活得：
 $D-LDH\text{活性}(U/g\text{质量})=66.67 \times x \div W \times F = 35.065 U/g\text{质量}$
3. 取500万细胞样本加入1mL提取液进行冰浴匀浆，按照测定步骤操作，用1mL玻璃比色皿测得计算 $\Delta A_{\text{测定}}=A_{\text{测定}}-A_{\text{对照}}=0.249-0.195=0.054$ ，带入标准曲线 $y=0.6126x+0.0162$ ，计算 $x=0.062$ ，按细菌/细胞数目计算酶活得：
 $D-LDH\text{活性}(U/10^4\text{cell})=0.133 \times x \times F = 0.008 U/10^4\text{cell}$
4. 取50 μL 胎牛血清，按照测定步骤操作，用1mL玻璃比色皿测得计算 $\Delta A_{\text{测定}}=A_{\text{测定}}-A_{\text{对照}}=0.360-0.217=0.143$ ，带入标准曲线 $y=0.6126x+0.0162$ ，计算 $x=0.207$ ，按液体体积计算酶活得：
 $D-LDH\text{活性}(U/mL)=66.67 \times x \times F = 13.800 U/mL$



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>