



L-乳酸脱氢酶 (L-LDH) 活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC0685

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 7 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂三	液体 7 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂四	液体 25 mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8°C保存

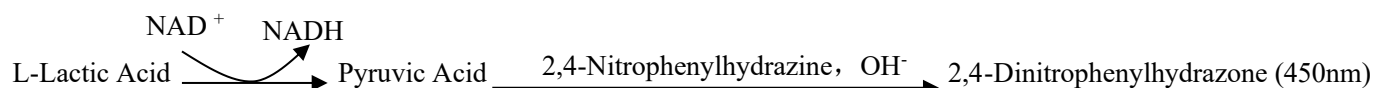
溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 1.3 mL 蒸馏水充分溶解备用，配好后可分装成小管-20°C保存，可保存 2 周，禁止反复冻融；
- 2、标准品：20 μmol/mL 丙酮酸钠溶液。

产品说明：

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。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、恒温水浴锅、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（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°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℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
3. 血清（浆）样本等液体：直接检测。若有浑浊离心后取上清测定即可。

二、测定步骤

- 1、分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至450nm，分光光度计蒸馏水调零。
- 2、标准品的配制：将 20 $\mu\text{mol/mL}$ 标准品用蒸馏水稀释至 2、1、0.5、0.25、0.125、0 $\mu\text{mol/mL}$ ，用 2、1、0.5、0.25、0.125、0 $\mu\text{mol/mL}$ 标准液做标准曲线。
- 3、标准溶液稀释可参考下表：

序号	稀释前浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)	标准溶液体积 (μL)	蒸馏水体积 (μL)	稀释后浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)
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：实验中每个标准管需10 μL 标准溶液。

4、样本测定

试剂名称(μL)	测定管	对照管	标准管
待测样本	10	10	-
标准液	-	-	10
试剂一	50	50	50
试剂二	10	-	-
蒸馏水	-	10	10
充分混匀，37℃准确水浴15min			
试剂三	50	50	50
充分混匀，37℃水浴15min			
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

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, 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, $\mu\text{mol/mL}$)。

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力单位。

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

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力单位。

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

(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。

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

(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力单位。

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

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；10³：1 μ mol/mL=10³nmol/mL。

注意事项：

1. ΔA 大于1.3或者小于0.01事，建议将样本用蒸馏水稀释或者增大样本量进行实验、

实验实例：

2. 称取0.103g景天叶片，加入1mL提取液，进行冰浴匀浆，8000g，4 $^{\circ}$ 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：

$$\text{L-LDH (U/g 质量)} = 66.67 \times x \div \text{W} = 86.74 \text{ U/g}$$

3. 称取0.109 g兔肝，加入1mL提取液，进行冰浴匀浆，8000g，4 $^{\circ}$ 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：

$$\text{L-LDH (U/g 质量)} = 66.67 \times x \div \text{W} \times \text{稀释倍数} = 61605.53 \text{ U/g}$$

4. 取50 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：

$$\text{L-LDH (U/mL)} = 66.67 \times x = 31.67 \text{ U/mL}$$

相关发表文献：

[1] Zhou F, Du J, Wang J. Albendazole inhibits HIF-1 α -dependent glycolysis and VEGF expression in non-small cell lung cancer cells[J]. Molecular and cellular biochemistry, 2017, 428(1-2): 171-178.

[2] Zhang H, Da Z, Feng Y, et al. Enhancing the electricity generation and sludge reduction of sludge microbial fuel cell with graphene oxide and reduced graphene oxide[J]. Journal of cleaner production, 2018, 186: 104-112.

[3] Zhao B, Sun L, Jiang X, et al. Genipin protects against cerebral ischemia-reperfusion injury by regulating the UCP2-SIRT3 signaling pathway[J]. European journal of pharmacology, 2019, 845: 56-64.

[4] Zhao H L, Wu B Q, Luo Y, et al. Exogenous hydrogen sulfide ameliorates high glucose-induced myocardial injury & inflammation via the CIRP-MAPK signaling pathway in H9c2 cardiac cells[J]. Life sciences, 2018, 208: 315-324.

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] Papanephytous C, Zervou ME, Theofanous A. Optimization of a Colorimetric Assay to Determine Lactate Dehydrogenase B Activity Using Design of Experiments[J]. Journal of Biomolecular Screening, 2021, 26(3): 383-399.

相关系列产品:

BC0740/BC0745 己糖激酶 (HK) 活性检测试剂盒

BC0540/BC0545 丙酮酸激酶 (PK) 活性检测试剂盒

BC2250/BC2255 3-磷酸甘油酸激酶 (PGK) 活性检测试剂盒

BC2270/BC2275 果糖-1,6-二磷酸醛缩酶 (FBA) 活性检测试剂盒