

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、200T/96S

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 100T	规格 200T	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	液体 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 7 mL×1 瓶	液体 12 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂三	液体 7 mL×1 瓶	液体 12 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 25 mL×1 瓶	液体 36 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1 mL×1 支	液体 1 mL×1 支	2-8℃保存

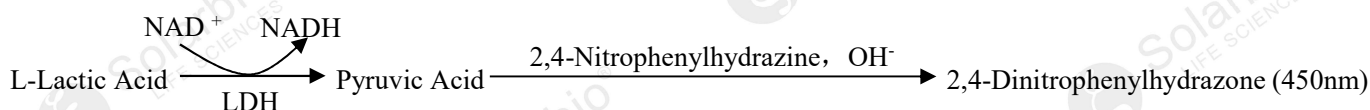
溶液的配制：

- 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℃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℃离心 10min，取上清，置冰上待测。





- 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。
- 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。

注：该试剂盒的样本匀浆上清也可用于 BC0090/BC0095（过氧化物酶）、BC0020/BC0025（丙二醛）、BC0200/BC0205（过氧化氢酶）、BC0170/BC0175（超氧化物歧化酶）、BC5160/BC5165（超氧化物歧化酶）的测定。

二、测定步骤

- 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。
- 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、0 μmol/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）	标准品体积（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
待测样本	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℃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 200μL 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ΔA=A 测定管-A 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，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。

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

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性单位。

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

(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。

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

(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。

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

V样：反应体系中加入的样本体积，10μL=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；10³：1μmol/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ΔA=A测定管-A对照管=0.275-0.199=0.076，带入标曲y=0.5218x+0.0063，R²=0.9983，得x=0.134 μmol/mL，计算乳酸脱氢酶活性得：
 $L-LDH (U/g \text{ 质量}) = 66.67 \times x \div W = 86.74 U/g$
2. 称取0.109 g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ΔA=A测定管-A对照管=0.795-0.132=0.663，带入标曲y=0.5218x+0.0063，R²=0.9983，得x=1.259 μmol/mL，计算乳酸脱氢酶活性得：
 $L-LDH (U/g \text{ 质量}) = 66.67 \times x \div W \times \text{稀释倍数} = 61605.53 U/g$
3. 取10μL马血清之后按照测定步骤操作，用96孔板测得计算ΔA=A测定管-A对照管=0.415-0.161=0.254，带入标曲y=0.5218x+0.0063，R²=0.9983，得x=0.475 μmol/mL，计算乳酸脱氢酶活性得：
 $L-LDH (U/mL) = 66.67 \times x = 31.67 U/mL$

相关发表文献：

- [1] Yang W, Liu LB, Liu FL, Wu YH, Zhen ZD, Fan DY, Sheng ZY, Song ZR, Chang JT, Zheng YT, An J, Wang PG. Single-cell RNA sequencing reveals the fragility of male spermatogenic cells to Zika virus-induced complement activation. Nat Commun. 2023 Apr 29;14(1):2476. doi: 10.1038/s41467-023-38223-z. PMID: 37120617; PMCID: PMC10148584.
- [2] Xiao W, Chen W, Wang Y, Zhang C, Zhang X, Zhang S, Wu W. Recombinant DTβ4-inspired porous 3D vascular graft enhanced antithrombogenicity and recruited circulating CD93+/CD34+ cells for endothelialization. Sci Adv. 2022 Jul 15;8(28):eabn1958. doi: 10.1126/sciadv.abn1958. Epub 2022 Jul 13. PMID: 35857526; PMCID: PMC9278867.





[3] Yu Y, Tian D, Yu Y, Lu L, Shi W, Liu G. Microplastics aggravate the bioaccumulation and corresponding food safety risk of antibiotics in edible bivalves by constraining detoxification-related processes. *Sci Total Environ*. 2024 Jan 15;908:168436. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.168436. Epub 2023 Nov 8. PMID: 37949129.

[4] Zhang M, Chen Y, Qiu Y, Sun J, He J, Liu Z, Shi J, Wei W, Wu G, Liang J. PCSK9 Promotes Hypoxia-Induced EC Pyroptosis by Regulating Smac Mitochondrion-Cytoplasm Translocation in Critical Limb Ischemia. *JACC Basic Transl Sci*. 2023 Aug 30;8(9):1060-1077. doi: 10.1016/j.jacbts.2023.05.016. PMID: 37791316; PMCID: PMC10544082.

[5] Zeng B, Chen Y, Chen H, Zhao Q, Sun Z, Liu D, Li X, Zhang Y, Wang J, Xing HR. Exosomal miR-211-5p regulates glucose metabolism, pyroptosis, and immune microenvironment of melanoma through GNA15. *Pharmacol Res*. 2023 Feb;188:106660. doi: 10.1016/j.phrs.2023.106660. Epub 2023 Jan 13. PMID: 36642112.

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] Papanepoytou 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

