

L-乳酸脱氢酶（L-LDH）活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

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：BC0680

规格：50T/24S

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 30 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 25 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂三	液体 25 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8℃保存

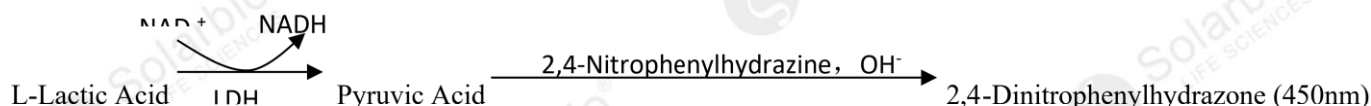
溶液的配制：

- 1、试剂二：临用时加入 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、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（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。





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：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

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、0μmol/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 (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	200	200	1
3	1	200	200	0.5
4	0.5	200	200	0.25
5	0.25	200	200	0.125
6	-	-	200	0

备注：下述实验中每个标准管需50μL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（在1.5mLEP管中加入下列试剂）

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	标准管
样本	50	50	-
标准品	-	-	50
试剂一	250	250	250
试剂二	50	-	-
蒸馏水	-	50	50
充分混匀，37℃水浴 15min			-
试剂三	250	250	250
充分混匀，37℃水浴 15min			-
试剂四	750	750	750
充分混匀，室温静置3min，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管，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, 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。

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



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 1 nmol 丙酮酸定义为一个酶活性单位。

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

(2) 按样本质量计算:

单位的定义: 每 g 组织每分钟催化产生 1 nmol 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 1 nmol 丙酮酸定义为一个酶活性单位。

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

V 样: 反应体系中加入的样本体积, 50 μL = 0.05 mL; V 样总: 加入的提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 15 min;

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; 10^3 : 单位换算系数, 1 $\mu\text{mol/mL}$ = 10^3 nmol/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 0.103 g 景天叶片, 加入 1 mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 8000g, 4°C 离心 10 min, 取上清置冰上待测。之后按照测定步骤操作, 用 1 mL 玻璃比色皿测得计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.206 - 0.134 = 0.072$, 带入标曲 $y = 0.6238x + 0.0227$, $R^2 = 0.9983$, 得 $x = 0.079 \mu\text{mol/mL}$, 计算乳酸脱氢酶活性得:

$$\text{L-LDH (U/g 质量)} = 66.67 \times x \div W = 51.14 \text{ U/g}$$

2. 称取 0.109 g 兔肝, 加入 1 mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 8000g, 4°C 离心 10 min, 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 1 mL 玻璃比色皿测得计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.936 - 0.095 = 0.841$, 带入标曲 $y = 0.6238x + 0.0227$, $R^2 = 0.9983$, 得 $x = 1.312 \mu\text{mol/mL}$, 计算乳酸脱氢酶活性得:

$$\text{L-LDH (U/g 质量)} = 66.67 \times x \div W \times \text{稀释倍数} = 64198.93 \text{ U/g}$$

3. 取 50 μL 马血清之后按照测定步骤操作, 用 1 mL 玻璃比色皿测得计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.529 - 0.155 = 0.374$, 带入标曲 $y = 0.6238x + 0.0227$, $R^2 = 0.9983$, 得 $x = 0.563 \mu\text{mol/mL}$, 计算乳酸脱氢酶活性得:

$$\text{L-LDH (U/mL)} = 66.67 \times x = 37.535 \text{ U/mL}$$

相关发表文献:

[1] Wu L, Chen F, Chang X, Li L, Yin X, Li C, Wang F, Li C, Xu Q, Zhuang H, Gu N, Hua ZC. Combined Cellular Thermometry Reveals That Salmonella typhimurium Warms Macrophages by Inducing a Pyroptosis-like Phenotype. J Am Chem Soc. 2022 Oct 26;144(42):19396-19409. doi: 10.1021/jacs.2c07287. Epub 2022 Oct 13. PMID: 36228296.

[2] Zheng X, Wang Q, Zhou Y, Zhang D, Geng Y, Hu W, Wu C, Shi Y, Jiang J. N-acetyltransferase 10 promotes colon cancer progression by inhibiting ferroptosis through N4-acetylation and stabilization of ferroptosis suppressor protein 1 (FSP1) mRNA. Cancer Commun (Lond). 2022 Dec;42(12):1347-1366. doi: 10.1002/cac2.12363. Epub 2022 Oct 8. PMID: 36209353; PMCID: PMC9759759.





[3] Jiang Y, Cao S, Zhou B, Cao Q, Xu M, Sun T, Zhao X, Zhou Z, Wang Y. Hemocytes in blue mussel *Mytilus edulis* adopt different energy supply modes to cope with different BDE-47 exposures. *Sci Total Environ.* 2023 Aug 10;885:163766. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.163766. Epub 2023 May 3. PMID: 37146804.

[4] Li L, Li F, Bai X, Jia H, Wang C, Li P, Zhang Q, Guan S, Peng R, Zhang S, Dong JF, Zhang J, Xu X. Circulating extracellular vesicles from patients with traumatic brain injury induce cerebrovascular endothelial dysfunction. *Pharmacol Res.* 2023 Jun;192:106791. doi: 10.1016/j.phrs.2023.106791. Epub 2023 May 6. PMID: 37156450.

[5] Zihan S, Lu L, Tao W, Bolin Z, Hongfei Z. Starch nanoparticles as a new ice crystal nucleator in *Lactobacillus bulgaricus* CICC 6097 cryoprotection. *Int J Biol Macromol.* 2023 Aug 17;251:126395. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.126395. Epub ahead of print. PMID: 37595719.

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] [1] Papaneophytou 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



本产品仅供科学研究使用。请勿用于临床、诊断、食品、化妆品检测等用途。

For research use only. Do not use for clinical, diagnostic, food, cosmetic testing and other purposes.