

D-乳酸脱氢酶（D-LDH）活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号：BC5280

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 20 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂三	液体 20 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

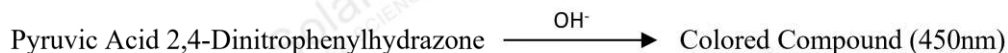
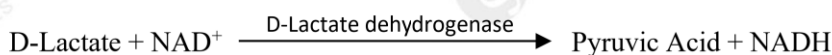
溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 1.6 mL 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。

产品说明：

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。

需自备的仪器和用品：

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（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（ 10^4 个）：提取液体体积（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）等其他液体：直接检测。若有沉淀请离心后取上清待测。

二、测定步骤

- 1、可见分光光度计预热30min以上，调节波长至450nm，蒸馏水调零。
- 2、标准溶液的稀释：将20 μ mol/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、0.03125 μ mol/mL标准溶液备用。
- 3、标准溶液稀释可参考下表：

序号	稀释前浓度（ μ mol/mL）	标准溶液体积（ μ L）	蒸馏水体积（ μ L）	稀释后浓度（ μ mol/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：下述实验中每个标准管需50 μ L标准溶液（注意不要在此步骤直接检测吸光度）。

4、在1.5mL EP管按下表步骤加样

试剂名称(μ L)	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℃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 活性计算

1. 标准曲线的绘制

根据标准管的浓度（x， μ mol/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活性计算

(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。

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

(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力单位。

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

(3) 按细菌/细胞数量计算

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。

$$\text{D-LDH活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = x \times V_{\text{样}} \div (N \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 \times F = 66.67 \times x \times F \div N$$

(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，0.05mL；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；10³：单位换算系数，

1μmol/mL=10³nmol/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。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 1mL 玻璃比色皿测得计算 ΔA 测定=A 测定-A 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 活性 (U/g 质量) = 66.67 × x ÷ W × F = 94.653 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 1mL 玻璃比色皿测得计算 ΔA 测定=A 测定-A 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 活性 (U/g 质量) = 66.67 × x ÷ W × F = 35.065 U/g 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 ΔA 测定=A 测定-A 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 活性 (U/10⁴ cell) = 0.133 × x × F = 0.008 U/10⁴ cell
- 4、取 50μL 胎牛血清，按照测定步骤操作，用 1mL 玻璃比色皿测得计算 ΔA 测定=A 测定-A 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 活性 (U/mL) = 66.67 × x × F = 13.800 U/mL

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] Huang Y N, Xu G T, You C P. The research progress of the lactate dehydrogenases in lactic acid bacteria[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, (08): 369-373.

相关系列产品:

- BC0540/BC0545 丙酮酸激酶 (PK) 活性检测试剂盒
- BC0680/BC0685 乳酸脱氢酶 (LDH) 活性检测试剂盒
- BC0740/BC0745 己糖激酶 (HK) 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

