

# 组织及血液L-乳酸脱氢酶（L-LDH）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AMHA3-C24	组织及血液L-乳酸脱氢酶（L-LDH）试剂盒	24T	常量法

## 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<sup>+</sup>/NADH之间互变。

L-LDH催化NAD<sup>+</sup>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。

## 试剂组成:

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。

## 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（10<sup>4</sup>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。

## 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20 $\mu$ mol/mL 标准品用蒸馏水稀释至2、1、0.5、0.25、0.125、0 $\mu$ mol/mL，用 2、1、0.5、0.25、0.125、0 $\mu$ mol/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 ( $\mu$ mol/mL)	标准品体积 ( $\mu$ L)	蒸馏水体积 ( $\mu$ L)	稀释后浓度 ( $\mu$ mol/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50 $\mu$ L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 ( $\mu$ L)	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 $\Delta A = A_{测定管} - A_{对照管}$ 。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， $\mu$ mol/mL）和吸光度 $\Delta A$ 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 $\Delta A$ （y， $\Delta A$ ）带入公式计算样本浓度（x， $\mu$ 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

义为一个酶活性单位。L-LDH 活性（U/mL）= x $\times$ V 样 $\div$ V 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 1nmol 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 1nmol 丙酮酸定义为一个酶活性单位。 L-LDH 活性 (U/10<sup>4</sup> 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 $\mu$ L=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: 细胞或细菌总数, 以万计; 10<sup>3</sup>: 单位换算系数, 1 $\mu$ mol/mL= 10<sup>3</sup>nmol/mL。

#### 注意事项:

1.  $\Delta A$ 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。