

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-M48	组织及血液L-乳酸脱氢酶（L-LDH）试剂盒	48T	微量法

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⁺/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。

试剂组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体7 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1支	-20℃保存
试剂三	液体7 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体25 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1.3 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（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。
- 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	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 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。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, 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。 $L\text{-LDH (U/mg prot)} = x \times V_{\text{样}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 = 66.7 \times x \div C_{\text{pr}}$

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

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

V样: 反应体系中加入的样本体积, 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 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。