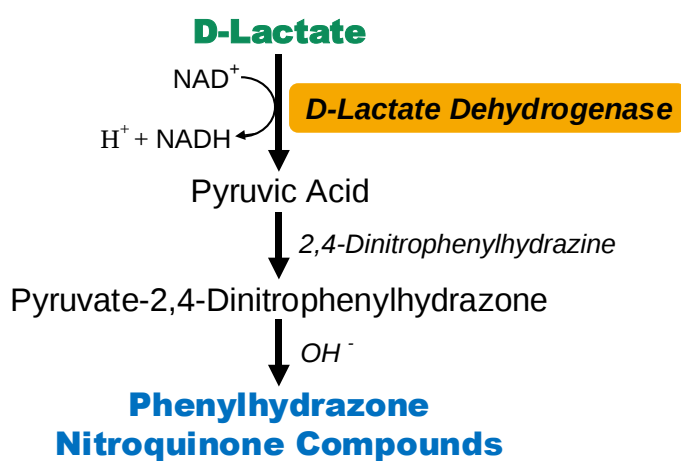




D-乳酸脱氢酶 (D-LDH) 活性检测试剂盒

D-Lactate Dehydrogenase (D-LDH) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



D-乳酸脱氢酶 (D-LDH) 活性检测试剂盒

D-Lactate Dehydrogenase (D-LDH) Activity Assay Kit

一、产品描述

乳酸脱氢酶 (LDH) 是生物体内糖酵解途径中至关重要的末端氧化还原酶, 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中, 能够催化丙酮酸与乳酸之间的可逆反应, 并伴随着 NAD^+/NADH 之间的互变, 乳酸脱氢酶活性的测定对于乳酸脱氢酶系特性研究、糖酵解途径分析和代谢异常引起的相关疾病诊断等方面具有重要的意义。

D-乳酸脱氢酶能够催化 NAD^+ 氧化 D-乳酸生成丙酮酸, 丙酮酸进一步与 2,4-二硝基苯肼反应生成丙酮酸二硝基苯腙, 在碱性溶液中显棕红色, 产物在 450 nm 处具有特征吸收峰, 通过吸光值变化即可表征 D-乳酸脱氢酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用说明及注意事项
提取液	液体 30 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	4°C 避光保存	-
试剂二	粉剂×1 支	-20°C 避光保存	使用前加入 1.6 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后 -20°C 可保存两周, 避免反复冻融)
试剂三	液体 20 mL×1 瓶	4°C 避光保存	-
试剂四	液体 60 mL×1 瓶	4°C 保存	-
标准液	液体 1 mL×1 支	4°C 避光保存	20 $\mu\text{mol/mL}$ 丙酮酸钠标准液
标准稀释液的制备: 将 20 $\mu\text{mol/mL}$ 丙酮酸钠标准液使用蒸馏水稀释至 1.2、1.0、0.5、0.25、0.125、0.0625 $\mu\text{mol/mL}$ 即为标准稀释液。			

序号	1	2	3	4	5	6
稀释前浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)	20	20	1.0	0.5	0.25	0.125
标准液体积 (μL)	60	50	200	200	200	200
蒸馏水体积 (μL)	940	950	200	200	200	200
稀释后浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)	1.2	1.0	0.5	0.25	0.125	0.0625

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：可见分光光度计、1 mL 玻璃比色皿（光径 10 mm）、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1.粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①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 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴匀浆，4℃ 8000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，按照细菌或细胞数量（ 10^4 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 1 mL 提取液）处理样品，冰浴超声破碎（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 10 s，重复 30 次），4℃ 8000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

③血清（浆）、培养液等液体样本：直接检测或适当稀释后再进行测定。

2.测定步骤

①分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 450 nm，蒸馏水调零。

②在离心管中依次加入下列试剂：

试剂	测定管 (μ L)	对照管 (μ L)	标准管 (μ L)	空白管 (μ L)
粗酶液	50	50	-	-
标准稀释液	-	-	50	-
试剂一	250	250	250	250
试剂二	50	-	-	-
蒸馏水	-	50	50	100
37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）准确反应 15 min				
试剂三	250	250	250	250
37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）反应 15 min				
试剂四	750	750	750	750
充分混匀，室温静置 3 min				

吸光值测定：吸取 1 mL 反应液至 1 mL 玻璃比色皿中，测定 450 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 对照、A 标准和 A 空白；计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。注：每个样品均需设一个对照管，空白管只需测定 1-2 次。

标准曲线的建立：1.2、1.0、0.5、0.25、0.125、0.0625 $\mu\text{mol/mL}$ 为横坐标（x），以其对应的 ΔA 标准为纵坐标（y），绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 $\Delta A_{\text{测定}}$ 带入公式中得到 x（ $\mu\text{mol/mL}$ ）。

3.D-乳酸脱氢酶 (D-LDH) 活性计算

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

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

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织每分钟生成 1 nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{D-LDH (U/g)} = \frac{x \times V_{\text{样}} \times V_{\text{样总}} \times 10^3}{W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{66.7 \times x}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{D-LDH (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{x \times V_{\text{样}} \times V_{\text{样总}} \times 10^3}{\text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{66.7 \times x}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每分钟生成 1 nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

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

注释： V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，50 μL =0.05 mL；V 样总：粗酶液总体积，1 mL；
T：酶促反应时间，15 min；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样品质量，g；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。

四、注意事项

①若测定吸光值超出标准吸光值线性范围：高于最高值建议将粗酶液适当稀释后再进行测定；低于最低值建议适当增加酶促反应时间或增加样本量重新制备粗酶液后再进行测定，计算时相应修改；

②为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

