CheKine™ D-乳酸脱氢酶（D-LDH）活性检测试剂盒（微量法）

货号: KTB1111　　规格: 48 T/48 S　96 T/96 S　　批号：见产品标签

≠	**检测范围：**0.031-2 μmol/mL		**灵敏度：**0.031 μmol/mL
	适用样本：动植物组织、细胞或细菌、血清（浆）		
	保质期：-20℃避光保存 6 个月		

01 背景与原理

乳酸脱氢酶（Lactate dehydrogenase，LDH）是一种糖酵解酶，广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，其中以肾脏含量较高。LDH 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 之间的互变。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）。

本试剂盒检测原理是 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。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Extraction Buffer	70 mL	70 mL×2	4℃
Reagent Ⅰ	7 mL	14 mL	4℃
Reagent Ⅱ	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20℃，避光保存
Reagent Ⅲ	7 mL	14 mL	4℃
Reagent Ⅳ	20 mL	40 mL	4℃
Reagent Ⅴ	100 μL	200 μL	-20℃，避光保存
Standard（100 μmol/mL）	1 mL	1 mL	4℃，避光保存

***请在实验前检查各组分的量。**

***各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。**

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 450 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	去离子水	试剂配制用
其他	匀浆器（组织样本）、离心机、恒温水浴锅、制冰机、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- **正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。**
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 建议实验者自行建立标准曲线以提高结果准确度。如未自行建立标准曲线，可参考结果展示部分的典型标准曲线公式进行结果计算。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，**请在实验全程做好生物安全防护**，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

05-1-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Extraction Buffer	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Reagent Ⅰ	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Working Reagent Ⅱ	临用前配制；48 T 加入 10 μL Reagent Ⅴ和 1.3 mL 去离子水，96 T 加入 20 μL Reagent Ⅴ和 2.6 mL 去离子水充分溶解待用	未用完的试剂分装后-20℃避光保存 1 个月，禁止反复冻融
Reagent Ⅲ	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Reagent Ⅳ	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Reagent Ⅴ	即用型；使用前平衡到室温	-20℃避光保存
Standard（100 μmol/mL）	即用型；使用前平衡到室温	4℃避光保存

05-1-2 标准品配制

使用 100 μmol/mL 标准品溶液，按下表所示，进行下一步稀释。每次实验都要做一次标准品检测，制作标曲；稀释后的标准品溶液不稳定，必须在 4 小时内使用。

序号	标准品（μL）	Extraction Buffer 体积（μL）	浓度（μmol/mL）
1	20 μL 100 μmol/mL	980	2
2	100 μL 2 μmol/mL	100	1
3	100 μL 1 μmol/mL	100	0.5
4	100 μL 0.5 μmol/mL	100	0.25
5	100 μL 0.25 μmol/mL	100	0.125
6	100 μL 0.125 μmol/mL	100	0.063
7	100 μL 0.063 μmol/mL	100	0.031
空白	0	100	0

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。测定时，应控制解冻的温度和时间。室温环境下解冻时，需在 4 h 内完成样品解冻。

- **细菌或细胞**：先收集细菌或细胞到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞或细菌，800 g 离心 2 min，弃上清液；按照细菌或细胞数量（10^4 个）：Extraction Buffer 体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 5×10^6 个细菌或细胞加入 1 mL Extraction Buffer）加入 Extraction Buffer，冰浴超声波破碎细胞或细菌 5 min（功率 20% 或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），8000 g，4℃离心 10 min，取上清液，置冰上待测；
- **组织**：按照组织质量（g）：Extraction Buffer 体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1 g 组织，加入 1 mL Extraction Buffer）加入 Extraction Buffer，进行冰浴匀浆。8000 g，4℃离心 10 min，取上清，置冰上待测。
- **血清（浆）**：直接检测。

05-3 实验步骤

1. **酶标仪准备**：预热 30 min 以上，调节波长到 450 nm。

2. **检测体系配制**：空白管和标准曲线只需测定 1 次，每个测定管需设置一个对照管。在 1.5 mL EP 管中按照如下方式操作：

试剂	测定管（μL）	对照管（μL）	标准管（μL）
待测样本	10	10	0
Standard	0	0	10
Reagent Ⅰ	50	50	50
Working Reagent Ⅱ	10	0	0
去离子水	0	10	10
充分混匀，37℃水浴 15 min			
Reagent Ⅲ	50	50	50
充分混匀，37℃水浴 15 min			
Reagent Ⅳ	150	150	150

3. **吸光度检测：**充分混匀，室温静置 30 min，取 200 μL 转移至 96 孔板中于 450 nm 处测定吸光度，分别记为 $A_{测定}$、$A_{对照}$、$A_{标准}$、$A_{空白}$。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧**二维码**或访问官网[https://www.abbkine.cn] > 进入“**技术中心**”> 查找“**在线计算器**”**工具**。

06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算$\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{对照}$、$\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白}$

2. 标准曲线绘制

以标准品浓度为 y 轴，$\Delta A_{标准}$为 x 轴，绘制标准曲线。将$\Delta A_{测定}$代入方程得到 y 值（μmol/mL）。

3. 样本 D-LDH 含量计算

- 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力单位。

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

- 按细胞或细菌数量计算：

单位的定义：每 10^4 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力单位。

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

- 按样本体积计算：

单位的定义：每 mL 血清（浆）每分钟催化产生 1 nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

D-LDH 活性（U/mL）$=y\times V_{样}\div V_{样}\div T\times 10^3$**$=66.67\times y$**

- 按样本蛋白浓度计算：

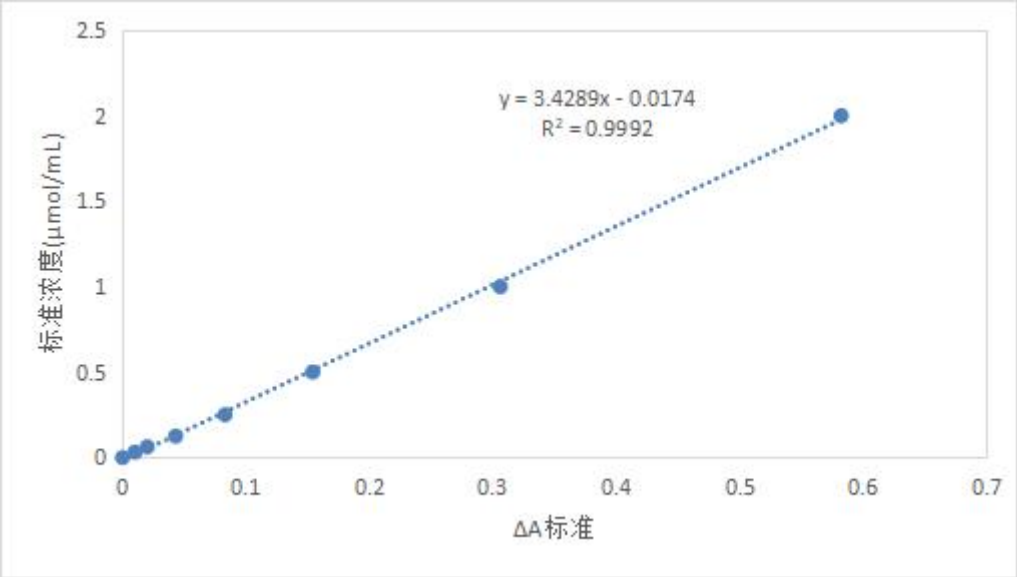
单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1 nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

D-LDH 活性（U/mg prot)=y×$V_{样}$÷(Cpr÷$V_{样总}$×$V_{样}$)÷T×10^3**=66.67×y÷Cpr**

$V_{样}$：反应体系中加入的样本体积，0.01 mL；$V_{样总}$：加入的 Extraction Buffer 体积，1 mL；T：反应时间，15 min；W：样本质量，g；N：细胞或细菌数量，以 10^4 为单位（例如细胞数量为 5×10^6，N=500）；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；10^3：单位换算系数，1 μmol/mL=10^3 nmol/mL。

07 结果展示

典型标准曲线：y=3.4289x-0.0174，R^2=0.9992



示例-1：取 0.1 g 小鼠肌肉，按照测定步骤操作，用 96 孔板进行检测。测得$\Delta A_{测定}$=$A_{测定}$-$A_{对照}$=0.157-0.103=0.054，代入标准曲线，计算 y=0.168。按样本质量计算得：D-LDH(U/g)=66.67×y÷W=112.006 U/g。

08 FAQ

- **检测得到的样本$\Delta A_{测定}$过高或者过低怎么办？**

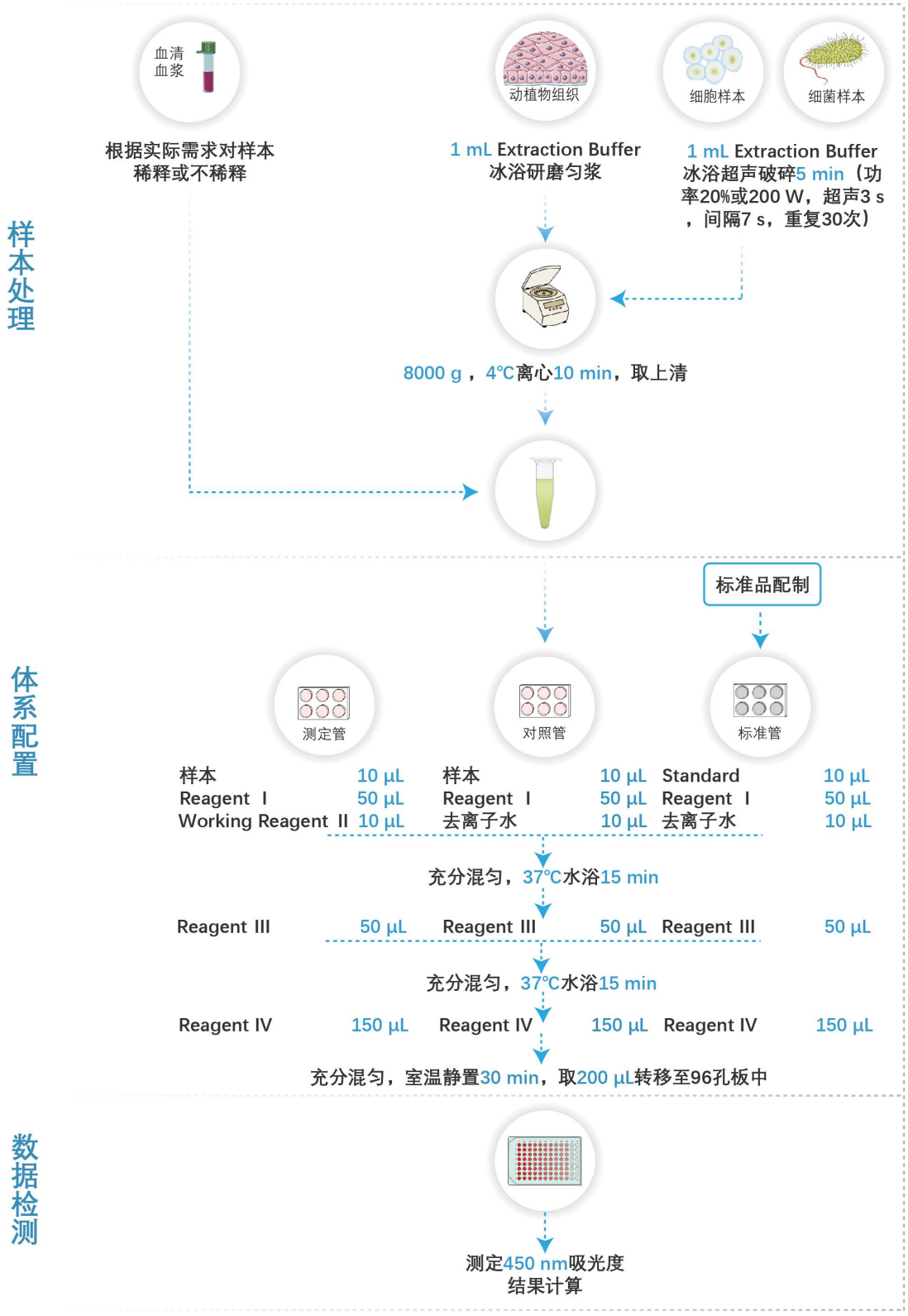
如果$\Delta A_{测定}$小于 0.01，可适当增大样本量；如果$\Delta A_{测定}$大于 0.5，样本可用 Extraction Buffer 进一步稀释，或减少提取用样本量，再重新进行测定。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB4010	CheKine™ 土壤硝酸还原酶（S-NR）活性检测试剂盒（微量法）
KTB4021	CheKine™ 亮氨酸氨基肽酶（LAP）活性检测试剂盒（微量法）

CheKine™ D-乳酸脱氢酶（D-LDH）含量检测流程示意图

（Abbkine 货号：KTB1111）



V1.0