

乳酸脱氢酶活性

规格：微量法 96 样

编号：ml968772

检测原理：WST-8 法

检测波长：450nm

注 意：

- 1、正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定；
- 2、为了您的安全和健康，请佩戴好防护用具；

测定意义：

乳酸脱氢酶（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，催化丙酮酸与乳酸之间的可逆反应，伴随着 NAD^+ /NADH 之间互变。

测定原理：

乳酸脱氢酶催化乳酸氧化生成丙酮酸，同时使 NAD^+ 还原生成 NADH 和 H^+ ，NADH 在 1-mPMS 的作用下使 WST-8 显橙黄色，通过测定 450nm 下吸光值增加速率，进而计算乳酸脱氢酶活性。

自备仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、离心机、恒温箱、震荡仪、冰、蒸馏水

试剂清单：

试剂名称	规格	数目	贮藏	
提取液	液体 110mL	x1	4°C	
试剂一	液体 10mL	x1	4°C	
试剂二	粉剂	x1	-20°C,避光	
试剂三	液体 5mL	x1	4°C,避光	
试剂四	液体 1.2mL	x1	-20°C,避光	
标准品	粉剂	x1	-20°C,避光	3.1mg NADH 标准粉剂

样本处理（按照步骤依次操作）：

一、组织样本

- 1、按照质量(g)：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例加入提取液，冰浴匀浆；
(样本取样量记为 W，提取液用量记为 V_提)
(建议先尝试 0.1g：1mL 的比例；样本含量较低的可增加样本量；样本量较少时可等比例减少样本与提取液)
- 2、然后 8,000g 离心力 4℃ 离心 10min，取上清测定。

二、细菌/细胞样本

- 1、按照细胞数量 (10^4 个)：提取液体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例加入提取液，冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；
(样本取样量记为 N (万个)，提取液用量记为 V_提)
(建议先尝试 500 万：1mL 的比例；样本含量较低的可增加样本量；样本量较少时可等比例减少样本与提取液)
- 2、然后 8,000g 离心力 4℃ 离心 10min，取上清测定。

三、液体样本

澄清样本可直接检测，若浑浊则离心取上清检测；

实验准备：

- 1、试剂二的制备：瓶中加入 6mL 蒸馏水，充分溶解，冰上放置；
(用不完的试剂 -20℃ 避光保存)
- 2、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm；
- 3、恒温箱加热至 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）；

测定操作：

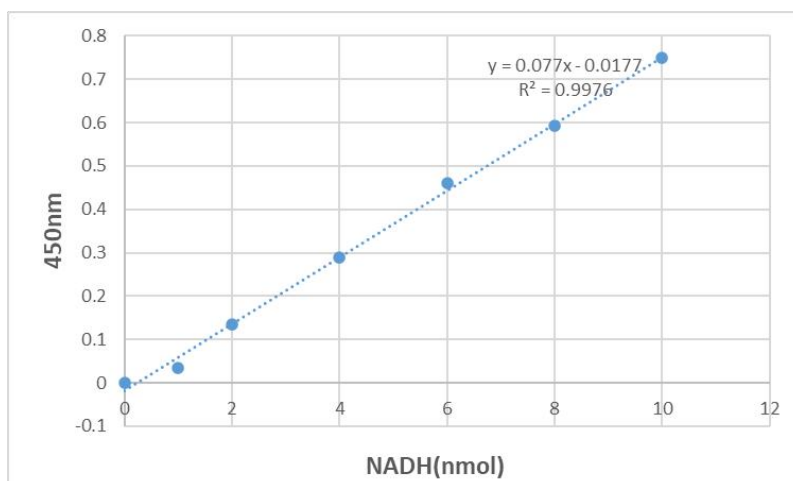
- 1、在 96 孔板中依次操作

试剂名称 (μL)	测定管	样本对照管 (*选做)
样本	10	10
试剂一	90	90
试剂三	40	-
蒸馏水	-	40
混匀		
试剂二	50	50
试剂四	10	10
混匀，立刻测定 450nm 下吸光值 A_1 ， 然后测定 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种） 避光反应 30min 后的 A_2 $\Delta A = A_2 - A_1$ 或 $\Delta A = A_{\text{测定}}(A_2 - A_1) - A_{\text{对照}}(A_2 - A_1)$		

注意：

- 1、样本含有 NADH、NADPH 等物质时会干扰检测，或样本存在很强的背景值时，需要设立对照管；(若每个样本都做对照管则该试剂盒由原来可测 96 样变为 48 样)
- 2、若 $\Delta A > 1$ 则超出试剂盒线性范围，建议将样本用提取液稀释后测定（稀释倍数(D)代入公式计算）；或缩短反应时间(T)（如由原本的 30min 缩短至 10min）；
- 3、若 $\Delta A < 0.02$ ，建议尝试增加样本取样量(W 或 N)测定，或减少提取液用量以提高样本浓度；或延长反应时间(T)（如由原本的 30min 延长至 40min）；或参考[*附件 2]改变反应体系；
- 4、乳酸脱氢酶的逆向反应（乳酸 → 丙酮酸）最适 pH 值多为 9.0~9.2，如需测定其他 pH 下的活性，可更换试剂一溶液（0.6mol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液）；

结果计算：结果计算：



(1) 按照蛋白含量计算

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。

$$\begin{aligned}\text{乳酸脱氢酶活性(U/mg prot)} &= [(\Delta A + 0.0177) \div 0.077] \div (C_{pr} \times V_{\text{样}}) \div T \times D \\ &= 43.29 \times (\Delta A + 0.0177) \div C_{pr} \times D\end{aligned}$$

(2) 按照样本质量计算

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。

$$\begin{aligned}\text{乳酸脱氢酶活性(U/g)} &= [(\Delta A + 0.0177) \div 0.077] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提}}) \div T \times D \\ &= 43.29 \times (\Delta A + 0.0177) \div W \times D\end{aligned}$$

(3) 按照细菌/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。

$$\begin{aligned}\text{乳酸脱氢酶活性(U/10}^4\text{ cell)} &= [(\Delta A + 0.0177) \div 0.077] \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提}}) \div T \times D \\ &= 43.29 \times (\Delta A + 0.0177) \div N \times D\end{aligned}$$

(4) 按照液体体积计算

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

$$\begin{aligned}\text{乳酸脱氢酶活性(U/mL)} &= [(\Delta A + 0.0177) \div 0.077] \div V_{\text{样}} \div T \times D \\ &= 43.29 \times (\Delta A + 0.0177) \times D\end{aligned}$$

$V_{\text{样}}$: 加入反应体系中样本体积, 0.01mL;

W : 样本质量, g;

$V_{\text{提}}$: 加入提取液体积, 1mL;

N : 细菌/细胞数量, 万个;

T : 反应时间, 30min;

C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL;

D : 额外稀释倍数, 未稀释即为 1;

预实验的意义:

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测, 以免造成试剂盒和样本的浪费 (比如低表达处理的样本);
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程, 尤其是初次使用生化试剂盒测定;
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适;
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题, 以便于及时作出调整;
- 5、通过 3 - 5 组预实验, 判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围, 指导实验样本稀释比例。

附 1：标准曲线的绘制（选做）

- 1、标准品^① 管中加入 874μL 蒸馏水充分溶解即为 5μmol/mL NADH 标准溶液；
- 2、将标准品母液(5μmol/mL) 使用蒸馏水稀释为 1、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1μmol/mL；
(也可根据自身实验需求调整标准品浓度)
- 3、依据加样表操作，根据结果绘制标准曲线

试剂名称 (μL)	标准管	空白管 (只做一管)
标准品	10	-
蒸馏水	-	10
试剂一	90	90
试剂三	40	40
混匀		
试剂二	50	50
试剂四	10	10
混匀，37℃避光反应 30min 于 450nm 测定吸光值 A, ΔA= A 标准- A 空白		

加入反应体系中的标准品量(nmol) = 标准品浓度(μmol/mL) × V1 × 10³

^① 微量粉剂 开盖前甩下或离心 使粉剂落入底部后 小心开盖

V1: 加入反应体系中标准品体积, 0.01mL; 10^3 : μmol 到 nmol 的换算系数, 1000;

例如: 10 μL 标准品 (1、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1 $\mu\text{mol/mL}$) 对应的 反应体系中的标准品量为 (10、8、6、4、2、1 nmol)

以加入反应体系中的标准品量 (nmol) 为横坐标 (x), 以其对应的 ΔA ($\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$) 为纵坐标 (y), 绘制拟合曲线, 即可得到线性方程 $y=kx+b$, 替代结果计算中的标准曲线方程;

附 2：对于低活性样本的测定方案（参考）

- 1、对于常规检测时吸光值过低的样本，可尝试通过增加样本加样体积($V_{\text{样}}$)的方式使其在反应体系中提高反应效果；(*改变反应体系后 需要用新的反应体系重做标准曲线)

例如增加到 40 μL ：

试剂名称 (μL)	测定管	样本对照管 (*选做)
样本	40	40
试剂一	90	90
试剂三	40	-
蒸馏水	-	40
混匀		
试剂二	50	50
试剂四	10	10
混匀，立刻测定 450nm 下吸光值 A_1 ， 然后测定 37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种） 避光反应 30min 后的 A_2 $\Delta A = A_2 - A_1$ 或 $\Delta A = A_{\text{测定}}(A_2 - A_1) - A_{\text{对照}}(A_2 - A_1)$		

(结果计算中的: $V_{\text{样}} = 0.04\text{mL}$, $T = 30\text{min}$)

标准曲线的绘制则改为：

试剂名称 (μL)	标准管	空白管（只做一管）
标准品	10	-
蒸馏水	30	10
试剂一	90	90
试剂三	40	40
混匀		
试剂二	50	50
试剂四	10	10
混匀，37°C避光反应 30min 于 450nm 测定吸光值 A , $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$		

(计算加入反应体系中的标准品量(nmol): $V1 = 0.01\text{mL}$)

- 2、替代结果计算中的标准曲线方程，并将 $V_{\text{样}}$ 代入重新计算