

乳酸脱氢酶 (Lactate Dehydrogenase, LDH) 试剂盒说明书

(微板法 96 样)

一、产品简介:

乳酸脱氢酶 LDH (EC 1.1.1.27) 是一种氧化还原酶, 催化丙酮酸与乳酸之间的相互转化, 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中, 通常测量 LDH 来评估组织或细胞的损伤状况。

本试剂盒提供一种快速、灵敏的检测方法: 乳酸脱氢酶 (LDH) 催化乳酸和 NAD^+ 反应生成丙酮酸和 NADH, 产生的 NADH 与特异显色剂反应, 产生在 450nm 处有最大吸收峰的黄色物质, 通过检测该黄色物质在 450nm 的增加速率, 进而计算出该酶活性大小。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 2.2mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 1.1mL×1 支	4℃保存	
试剂三	液体 3mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

【注】: 粉剂量在 mg 级别, 使用前用手甩几次或者进行离心, 打开直接加入要求的试剂即可。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、水浴锅和冰。

四、乳酸脱氢酶 (LDH) 活性检测:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品和实验流程, 避免样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本: 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例提取。

② 细菌/细胞样本: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 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 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细胞数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为 1000~5000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 450nm。

② 所有试剂解冻至室温 (25℃) 或置于水浴锅 (25℃) 中孵育 15-30min。

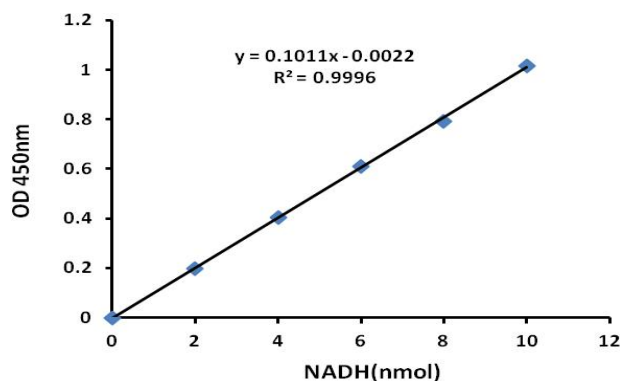
③ 提取液和试剂一和二和三可按照 140:20:10:20 比例配成混合液 (一枪加 190μL 该混合液) (该混合液用多少配多少, 现配现用)。在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	10
提取液	140
试剂一	20
试剂二	10
试剂三	20
混匀, 在室温 (25℃) 下, 立即于 450nm 处读取 A1 值, 10min 后读取 A2 值, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

- 【注】: 1. 若 ΔA 小于 0.01, 可以延长反应时间 T (如: 30min 或更长), 或增加样本量 V1 (如增至 40 μ L, 则提取液相应减少); 则调整后的 V1 和 T 需代入计算公式重新计算。
2. 若样本自身含有高浓度的还原型物质 (如 VC 等), 需增加一个样本自身对照: 10 μ L 样本+160 μ L 提取液+20 μ L 试剂一+10 μ L 试剂二, 检测同测定管, $\Delta A = (A_2 - A_1)$ 测定 - (A2-A1) 对照。

五、结果计算:

- 1、标准曲线: $y = 0.1011x - 0.0022$; x 是 NADH 摩尔质量 (nmol), y 是 ΔA 。



- 2、按样本蛋白浓度计算:

酶活性定义: 每毫克组织蛋白每分钟催化 1 nmol 乳酸转化成丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{LDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0022) \div 0.1011] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 98.9 \times (\Delta A + 0.0022) \div \text{Cpr}$$

- 3、按样本鲜重计算:

酶活性定义: 每克组织每分钟催化 1 nmol 乳酸转化成丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{LDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0022) \div 0.1011] \div (W \times V1 \div V) \div T = 98.9 \times (\Delta A + 0.0022) \div W$$

- 4、按细菌/细胞密度计算:

酶活性定义: 每 1 万个细菌/细胞每分钟催化 1 nmol 乳酸转化成丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{LDH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0022) \div 0.1011] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.2 \times (\Delta A + 0.0022)$$

- 5、按液体体积计算:

酶活性定义: 每毫升液体每分钟催化 1 nmol 乳酸转化成丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{LDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0022) \div 0.1011] \div V1 \div T = 98.9 \times (\Delta A + 0.0022)$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.01mL;

T---反应时间, 10min;

W---样本质量, g;

500---细胞或细菌总数; 万;

Cpr---蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (2nmol/ μ L): 向标准品 EP 管里面加入 0.7mL 蒸馏水 (母液需在两天内用且-20 $^{\circ}$ C保存)。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. nmol / μ L。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 按照 10 μ L 的各个浓度标准品+180 μ L 提取液+10 μ L 试剂二, 混匀后孵育 10min 后于 450nm 处读取终点值, 根据结果即可制作标准曲线。