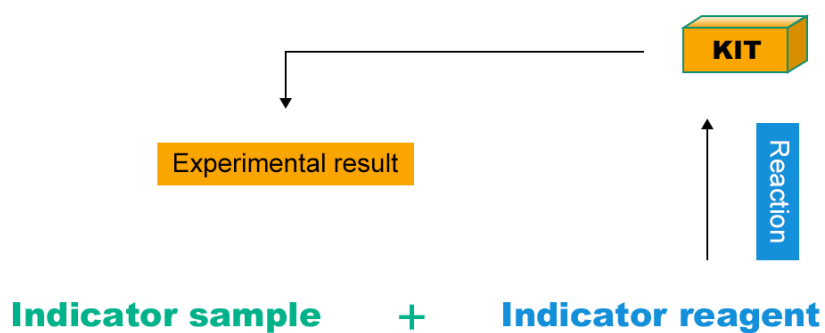


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0309

Size: 100T/48S

乳酸脱氢酶 (LDH) 检测试剂盒说明书

微量法

***正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定**

一、测定意义:

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

二、测定原理:

LDH 催化 NAD^+ 氧化乳酸生成丙酮酸, 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。

三、需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	60mL×1 瓶	4℃保存	—
试剂一	液体 5 mL×1 瓶	4℃保存	—
试剂二	粉剂×1 支	-20℃保存	用时加入 1.3 mL 双蒸水充分溶解备用，现配现用
试剂三	液体 5 mL×1 瓶	4℃保存	—
试剂四	液体 20 mL×1 瓶	4℃保存	

五、操作步骤：

1. 样品测定的准备：

(1) 细菌或培养细胞：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 (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 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），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）样品：直接检测。

2. 测定操作:

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

(2) 样本测定 (在 EP 管中加入下列试剂)

试剂名称(μL)	测定管	对照管
样本	10	10
试剂一	50	50
试剂二	10	
蒸馏水		10
试剂三	50	50

充分混匀, 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 水浴 15min

试剂四	150	150
-----	-----	-----

充分混匀, 室温静置 3min, 450 nm 下测定吸光度, 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管。

六、LDH 活力单位计算:

A、用微量石英比色皿测定的计算公式如下:

1. 标准条件下测定的回归曲线, $y = 0.725x$ (x 为标准品浓度, $\mu\text{mol/mL}$; y 为对吸光度)。

2. 血清 (浆) 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力单位。

$$\text{LDH (U/mL)} = \Delta A \div 0.725 \div T \times 10^3 = 92 \times \Delta A$$

3. 细胞、细菌和组织中 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力单位。

$$\text{LDH (U/mg prot)} = [\Delta A \div 0.725 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \times 10^3 = 92 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

需要另外测定，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒（ZC-S0470）。

(2) 按样本鲜重计算：

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。

$$\text{LDH (U/g 鲜重)} = [\Delta A \div 0.725 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) \div T \times 10^3 = 92 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

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。

$$\text{LDH (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \div 0.725 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) \div T \times 10^3 = 0.184 \times \Delta A \div W$$

V1：加入反应体系中样本的体积，0.01 mL；V2：加入提取液的体积，1 mL；T：反应时间，15 min；Cpr：蛋白质浓度，mg/mL；W：样品质量，g；500：细胞或细菌总数，500 万。 10^3 ：1 $\mu\text{mol/mL} = 10^3 \text{nmol/mL}$ 。

B、用 96 孔板测定的计算公式如下：

1. 标准条件下测定的回归曲线， $y = 0.3625x$ (x 为标准品浓度， $\mu\text{mol/mL}$ ；y 为对吸光度)。

2. 血清（浆）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力单位。

$$\text{LDH (U/mL)} = \Delta A \div 0.3625 \div T \times 10^3 = 184 \times \Delta A$$

3. 细胞、细菌和组织中 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 1 nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{LDH (U/mg prot)} = [\Delta A \div 0.3625 \times V_1] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T \times 10^3 = 184 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

需要另外测定，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒 (ZC-S0470)。

(2) 按样本鲜重计算：

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。

$$\text{LDH (U/g 鲜重)} = [\Delta A \div 0.725 \times V_1] \div (W \times V_1 \div V_2) \div T \times 10^3 = 184 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

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。

$$\text{LDH (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \div 0.3625 \times V_1] \div (500 \times V_1 \div V_2) \div T \times 10^3 = 0.368 \times \Delta A \div W$$

V1：加入反应体系中样本的体积，0.01 mL；V2：加入提取液的体积，1 mL；T：反应时间，15min；Cpr：蛋白质浓度，mg/mL；W：样品质量，g；500：细胞或细菌总数，500 万。

10^3 ：1 $\mu\text{mol/mL} = 10^3 \text{nmol/mL}$ 。