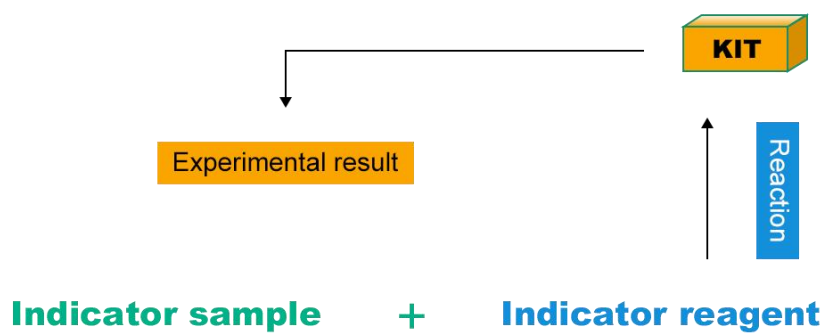


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0309

Size: 100T/48S

乳酸脱氢酶 (LDH) 活性检测试剂盒说明书

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，如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

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、微量玻璃比色皿/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	液体 60mL × 1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 7mL × 1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 × 1 瓶	-20℃ 保存	
试剂三	液体 7mL × 1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	液体 25mL × 1 瓶	4℃ 保存	
标准液	液体 1mL × 1 支	4℃ 保存	

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 1.3 mL 双蒸水充分溶解备用，配好后可分装成小管-20℃保存，可保存两周，禁止反复冻融；
- 2、标准品：2 μmol/mL 丙酮酸钠溶液。

五、操作步骤：

● 样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 细菌、细胞或组织样本的制备：

细菌或培养细胞：先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。

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。

2. 血清（浆）样本：直接检测。

● 测定步骤

- 1、分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至450nm，蒸馏水调零。
- 2、标准品的制备：取100 μL 标准液，倍比稀释至1、0.5、0.25、0.125、0 μmol/mL，用2、1、0.5、0.25、0.125、0 μmol/mL 做标准曲线。

3、样本测定

试剂名称(μL)	测定管	对照管	标准管
待测样本	10	10	—
标准液	—	—	10
试剂一	50	50	50
试剂二	10	—	—
蒸馏水	—	10	10
充分混匀, 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 准确水浴 15min			
试剂三	50	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	150

充分混匀, 室温静置 3min, 取 200 μL 转移至微量玻璃比色皿或在 96 孔板中, 450nm 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。

六、LDH 活力单位计算

1. 标准曲线的绘制: 根据标准管测定值和浓度做标准曲线, y 为标准品浓度, $\mu\text{mol/mL}$; x 为对吸光度 (减去浓度为 0 的标准管的 OD 值)。

2. 计算样本丙酮酸的含量, 即将 ΔA 带入回归方程中 (x), 计算 y 值。

3. 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。

$$\text{LDH (U/mL)} = y \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T \times 10^3 = 66.7 \times y$$

4. 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。

$$\text{LDH (U/mg prot)} = y \times V_{\text{样}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 = 66.7 \times y \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本质量计算

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。

$$\text{LDH (U/g 质量)} = y \times V_{\text{样}} \div (W \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 = 66.67 \times y \div W$$

(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。

$$\text{LDH (U/10}^4 \text{ cell)} = y \times V_{\text{样}} \div (500 \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 = 0.133 \times y$$

V 样：反应体系中加入的样本体积，10 μL =0.01mL；V 样总：加入的提取液体积，1mL；T：反应时间，15min；Cpr：蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细胞或细菌总数，500 万； 10^3 ：1 $\mu\text{mol/mL}$ = 10^3nmol/mL 。