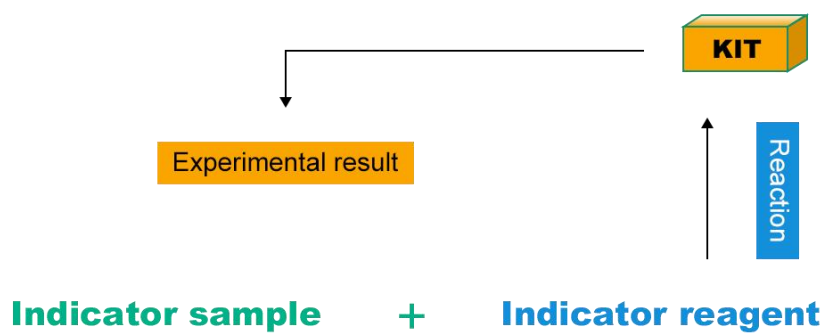


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0577

Size: 50T/24S

乳酸脱氢酶 (LDH) 活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*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、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵/匀浆器、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 30mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 25mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉剂 × 1 支	-20°C 保存	
试剂三	液体 25mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂四	液体 60mL × 1 瓶	4°C 保存	
标准品	液体 1mL × 1 支	4°C 保存	

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用时加入 1.3mL 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。
- 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）样本：直接检测。

● 测定步骤

- 1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 450nm，蒸馏水调零。
- 2、标准品的配制：取 100 μL 标准液，用蒸馏水倍比稀释至 1、0.5、0.25、0.125、0 μmol/mL，用 2、1、0.5、0.25、0.125、0 μmol/mL 标准液做标准曲线。

3、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	标准管
样本	50	50	—
标准液	—	—	50
试剂一	250	250	250
试剂二	50	—	—
蒸馏水	—	50	50
充分混匀，37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 15min			
试剂三	250	250	250
充分混匀，37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 15min			
试剂四	750	750	750

充分混匀，室温静置 3min，450nm 下测定吸光度，样本计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。
每个测定管需要设一个对照管。

六、LDH 活力单位计算

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（ $\mu\text{mol/mL}$ ）。

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

- 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。

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

- 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。

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

- 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, 50 μL = 0.05mL; 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 : 单位换算系数, 1 $\mu\text{mol/mL}$ = 10^3nmol/mL 。