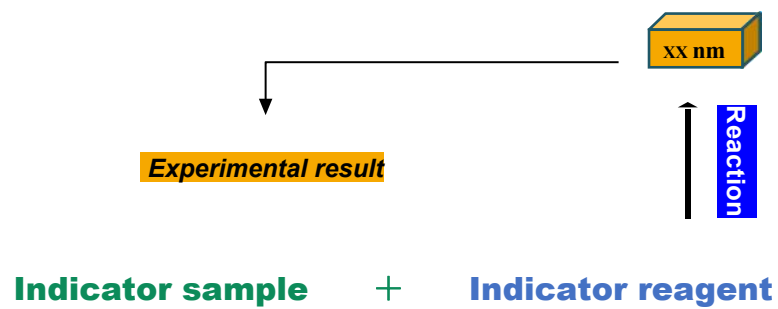


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

乳酸脱氢酶试剂盒说明书

可见分光光度法

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

产品内容：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	30mL × 1 瓶	4℃ 保存	—
试剂一	液体 15 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，配好后 -20 °C 保存，可保存两周，禁止反复冻融；
试剂三	液体 15 mL × 1 瓶	4℃ 保存	—
试剂四	液体 50 mL × 1 瓶	4℃ 保存	—

产品简介：

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。

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。

试验中所需的仪器和试剂：

可见分光光度计、恒温水浴锅、台式离心机、移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、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。

血清（浆）样品：直接检测。

3. 二、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	50	50
试剂一	250	250
试剂二	50	
蒸馏水		50
试剂三	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
-----	-----	-----

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。

LDH 活力单位计算：

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 1 nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{LDH (U/mg prot)} = [\Delta A \div 0.725 \times V_1] \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \div T \times 10^3 = 92 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

需要另外测定，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

(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。

$$\text{LDH (U/g 鲜重)} = [\Delta A \div 0.725 \times V_1] \div (W \times V_1 \div V_2) \div T \times 10^3 = 92 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{LDH (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \div 0.725 \times V_1] \div (500 \times V_1 \div V_2) \div T \times 10^3 = 0.184 \times \Delta A \div W$$

V1：加入反应体系中样本的体积，0.05 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。