



总乳酸脱氢酶 (LDH) 检测试剂盒说明书

(货号: PB1029W96 微板法 96样)

有效期: 3个月

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

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。

测定原理:

乳酸脱氢酶能够催化 NAD^+ 氧化乳酸生成丙酮酸, 丙酮酸进一步与 2,4-二硝基苯肼反应生成 丙酮酸二硝基苯腙, 在碱性溶液中显棕红色, 产物在 450 nm 处具有特征吸收峰, 通过吸光值变化即可表征乳酸脱氢酶的活性。

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。

试剂的组成和配制:

提取液: 液体 100mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂一: 液体 12 mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 粉剂×2 支, 4℃ 保存, 用时加入 1.3 mL 双蒸水充分溶解备用, 配好后 4℃ 保存

试剂三: 液体 12 mL×1 瓶, 4℃ 避光保存;

试剂四: 液体 40 mL×1 瓶, 4℃ 保存;

标准品: 液体 1 mL×1 支, 10 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ 标准品溶液, 4℃ 避光保存;

样品测定的准备:

1、细菌、细胞或组织样品的制备:

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 1000~5000: 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) 样品: 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、标准曲线的制备:

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦
标准品浓度($\mu\text{mol}/\text{mL}$)	1.2	1.0	0.5	0.25	0.125	0.0625	0
稀释前标准品浓度 ($\mu\text{mol}/\text{mL}$)	10	10	10	0.5	0.25	0.125	0.125
标准液体积 (μl)	120	100	50	200	200	200	0



蒸馏水体积 (μl)	880	900	950	200	200	200	200
------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

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	10	10	
标准品			10
试剂一	50	50	50
试剂二	10		
蒸馏水		10	10
充分混匀, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 准确水浴 15min			
试剂三	50	50	50
充分混匀, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 准确水浴 15min			
试剂四	150	150	150
充分混匀, 室温静置 10min			

吸取 200 μL 反应液至微量玻璃比色皿或 96 孔板中, 测定 450 nm 处吸光值, 记为 A 测定、A 对照、A 标准; 计算 ΔA 测定 = A 测定 - A 对照, ΔA 标准 = A 标准 - A 空白 (0 μmol/ml)。注: 每个样品均需设一个对照管。

LDH 活力计算:

1、标准曲线的绘制以各标准溶液浓度为 x 轴, 以其对应的吸光值 (ΔA 标准) 为 y 轴, 绘制标准曲线, 得到标准方程 $y=kx+b$, 将 ΔA 测定带入公式中得到 x (μmol/ml)。

2、乳酸脱氢酶 (LDH) 活性计算

(1) 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化产生 1 nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

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

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每 g 组织在反应体系中每分钟催化产生 1nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{LDH (U/g 鲜重)} = x \times V_{\text{样}} \times V_{\text{样总}} \times 10^3 \div V_{\text{样}} \div T \div W = 66.7 \times x \div W$$

(3) 按液体体积计算:

单位的定义: 每 mL 液体样本每分钟生成 1 nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

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

(4) 按细菌或细胞数量计算:

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟生成 1nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

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

V 样总: 加入提取液体积, 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 : 单位换算系数, $1 \mu\text{mol/mL} = 10^3 \text{ nmol/mL}$ 。

注意事项

若测定吸光值超出标准吸光值线性范围: 高于最高值建议将粗酶液适当稀释后再进行测定; 低于最低值建议适当增加酶促反应时间或增加样本量重新制备粗酶液后再进行测定, 计算时相应修改