

乳酸脱氢酶 (LDH) 检测试剂盒说明书

(货号: ADS-W-FM003-96 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

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。

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。

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°C 保存;

试剂一: 液体 10 mL×1 瓶, 4°C 保存;

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

试剂三: 液体 10 mL×1 瓶, 4°C 保存;

试剂四: 液体 40 mL×1 瓶, 4°C 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°C 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°C 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、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
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
充分混匀, 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 准确水浴 15min		
试剂四	150	150

充分混匀，室温静置 15min，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活力单位的计算：

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）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。

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

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。

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

需要另外测定，建议使用本公司BCA蛋白质含量测定试剂盒。

(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。

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

(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。

$$\text{LDH (U/104 cell)} = \Delta A \div 0.725 \div T \div (500 \div V_{\text{样总}}) \times 10^3 = 0.184 \times \Delta A$$

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。

b. 使用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）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。

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

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。

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

需要另外测定，建议使用本公司BCA蛋白质含量测定试剂盒。

(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。

$$\text{LDH (U/g鲜重)} = \Delta A \div 0.3625 \div T \div (W \div V_{\text{样总}}) \times 10^3 = 184 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{LDH (U/104 cell)} = \Delta A \div 0.3625 \div T \div (500 \div V_{\text{样总}}) \times 10^3 = 0.368 \times \Delta A$$

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。