

## 乳酸脱氢酶（Lactate Dehydrogenase, LDH）试剂盒说明书

（货号：ADS-W-FM003 微板法 48 样）

### 一、产品简介：

乳酸脱氢酶 LDH (EC 1.1.1.27) 是一种氧化还原酶，催化丙酮酸与乳酸之间的相互转化，广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，通常测量 LDH 来评估组织或细胞的损伤状况。

本试剂盒提供一种快速、灵敏的检测方法：乳酸脱氢酶（LDH）催化乳酸和 NAD<sup>+</sup> 反应生成丙酮酸和 NADH，产生的 NADH 与特异的显色剂反应，产生在 450nm 处有最大吸收峰的物质，通过检测该黄色物质在 450nm 的增加速率，进而计算出乳酸脱氢酶活性的大小。

### 二、试剂盒的组成和配制：

| 试剂名称 | 规格           | 保存要求  | 备注            |
|------|--------------|-------|---------------|
| 提取液  | 液体 60mL×1 瓶  | 4℃ 保存 |               |
| 试剂一  | 液体 1mL×1 瓶   | 4℃ 保存 |               |
| 试剂二  | 液体 0.5mL×1 支 | 4℃ 保存 |               |
| 试剂三  | 液体 1.5mL×1 瓶 | 4℃ 保存 |               |
| 标准品  | 粉体 mg×1 支    | 4℃ 保存 | 若重新做标曲，则用到该试剂 |

【注】：粉剂量在 mg 级别，使用前用手甩几次或者进行离心，打开直接加入要求的试剂即可。

### 三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

### 四、乳酸脱氢酶（LDH）活性检测：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

#### 1、样本制备：

① 组织样本：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm，4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例提取

② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 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）；12000rpm，4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌或细胞数量（10<sup>4</sup> 个）：提取液体积（mL）为 1000~5000：1 的比例进行提取

③ 液体样本：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

#### 2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）。

③ 在 96 孔板中依次加入：

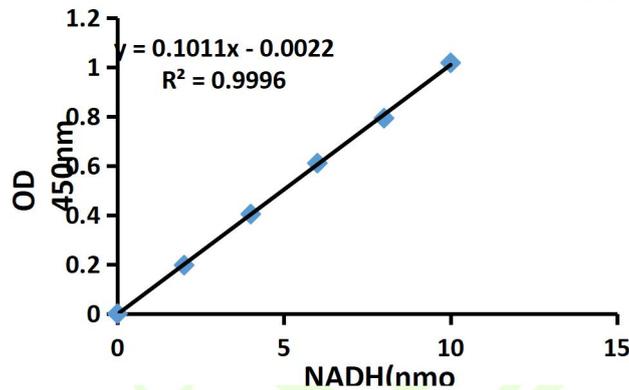
| 试剂名称（μL）                 | 测定管 |
|--------------------------|-----|
| 样本                       | 10  |
| 提取液                      | 140 |
| 试剂一                      | 20  |
| 试剂二                      | 10  |
| 试剂三                      | 20  |
| 混匀，在室温（25℃）下，立即于 450nm 处 |     |

读取 A1 值, 10min 后读取 A2 值,  $\Delta A = A2 - A1$ 。

- 【注】：1. 若  $\Delta A$  在零附近, 可以延长反应时间 T (如: 30min 或更长), 或增加样本量 V1 (如增至 40 $\mu$ L, 则提取液相应减少); 则调整后加样体积 V1 和反应时间 T 需代入计算公式重新计算。
2. 若样本自身含有高浓度的还原型物质 (如 VC 等), 需增加一个样本自身对照: 10 $\mu$ L 样本+160 $\mu$ L 提取液+20 $\mu$ L 试剂一+10 $\mu$ L 试剂二, 检测同测定管,  $\Delta A = (A2 - A1)$  测定 -  $(A2 - A1)$  对照。

## 五、结果计算:

1、标准曲线:  $y = 0.1011x - 0.0022$ ; x 是 NADH 摩尔质量 (nmol), y 是  $\Delta A$ 。



2、按样本蛋白浓度计算:

酶活性定义: 每毫克组织蛋白每分钟催化 1 nmol 乳酸转化成丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{LDH (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0022) \div 0.1011] \div (V1 \times Cpr) \div T = 98.9 \times (\Delta A + 0.0022) \div Cpr$$

3、按样本鲜重计算:

酶活性定义: 每克组织每分钟催化 1 nmol 乳酸转化成丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{LDH (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0022) \div 0.1011] \div (W \times V1 \div V) \div T = 98.9 \times (\Delta A + 0.0022) \div W$$

4、按细菌/细胞密度计算:

酶活性定义: 每 1 万个细菌/细胞每分钟催化 1 nmol 乳酸转化成丙酮酸定义为一个酶活单位。

$$\text{LDH (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0022) \div 0.1011] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.2 \times (\Delta A + 0.0022)$$

5、按液体体积计算:

酶活性定义: 每毫升液体每分钟催化 1 nmol 乳酸转化成丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{LDH (nmol/min/mL)} = [(\Delta A + 0.0022) \div 0.1011] \div V1 \div T = 98.9 \times (\Delta A + 0.0022)$$

V: 加入提取液体积, 1 mL;

V1: 加入样本体积, 0.01mL;

T: 反应时间, 10min;

W: 样本质量, g;

500: 细胞或细菌总数; 500 万;

Cpr: 蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (1nmol/ $\mu$ L): 向标准品 EP 管里面加入 1.41ml 蒸馏水 (母液需在两天内用且 -20 $^{\circ}$ C 保存)。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. nmol / $\mu$ L。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样表操作, 根据结果即可制作标准曲线。