

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

微量法 100管/48样

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：60mL×1瓶，4°C保存；

试剂一：液体5 mL×1瓶，4°C保存；

试剂二：粉剂×1支，-20°C保存，用时加入10μL试剂五和1.3 mL蒸馏水充分溶解备用，用不完的试剂分装后-20°C保存，禁止反复冻融；

试剂三：液体5 mL×1瓶，4°C保存；

试剂四：液体20 mL×1瓶，4°C保存；

试剂五：液体100μL×1支，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（10⁴个）：提取液体积（mL）为1000~5000：1的比例（建议2000万细菌或细胞加入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。

乳酸脱氢酶（Lactate Dehydrogenase, LDH）试剂盒说明书测定步骤：

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， $y = 0.9108x + 0.0037$ （x为标准品浓度， $\mu\text{mol/mL}$ ；y为 ΔA ）。

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。

$$\text{LDH (nmol/min/mL)} = (\Delta A - 0.0037) \div 0.9108 \div T \times 10^3 = 73.2 \times \Delta A$$

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。

$$\text{LDH (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A - 0.0037) \div 0.9108 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \times 10^3 = 73.2 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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组织每分钟催化产生1nmol丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{LDH (nmol/min/g鲜重)} = [(\Delta A - 0.0037) \div 0.9108 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) \div T \times 10^3 = 73.2 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{LDH (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A - 0.0037) \div 0.9108 \times V1] \div (2000 \times V1 \div V2) \div T \times 10^3 = 0.037 \times \Delta A$$

V1：加入反应体系中样本体积，0.01mL；V2：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：样本质量，g；2000：细胞或细菌总数，2000万； 10^3 ： $1\mu\text{mol/mL} = 10^3 \text{ nmol/mL}$ 。

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， $y = 0.4554x + 0.0037$ （x为标准品浓度， $\mu\text{mol/mL}$ ；y为 ΔA ）。

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。

$$\text{LDH (nmol/min/mL)} = (\Delta A - 0.0037) \div 0.4554 \div T \times 10^3 = 146.4 \times (\Delta A - 0.0037)$$

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。

$$\text{LDH (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A - 0.0037) \div 0.4554 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \times 10^3 = 146.4 \times (\Delta A - 0.0037) \div \text{Cpr}$$

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组织每分钟催化产生1nmol丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{LDH (nmol/min/g鲜重)} = [(\Delta A - 0.0037) \div 0.4554 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) \div T \times 10^3 = 146.4 \times (\Delta A - 0.0037) \div W$$

(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。

$$\text{LDH (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A - 0.0037) \div 0.4554 \times V1] \div (2000 \times V1 \div V2) \div T \times 10^3 = 0.073 \times (\Delta A - 0.0037)$$

V1：加入反应体系中样本体积，0.01mL；V2：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：样本质量，g；2000：细胞或细菌总数，2000万； 10^3 ：1umol/mL= 10^3 nmol/mL。

1、标准曲线线性范围为：0.1 umol/mL -2 umol/mL。

2、 ΔA 线性范围为：0.01 -1。