

乳酸脱氢酶 (Lactate Dehydrogenase,LDH) 试剂盒说明书 (微板法96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⁺反应生成丙酮酸和NADH，产生的NADH 与特异显色剂反应，产生在450nm 处有最大吸收峰的黄色物质，通过检测该黄色物质在450nm 的增加速率，进而计算出该酶活性大小。

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120mL×1瓶	4℃保存	
试剂一	液体2.2mL×1瓶	4℃保存	
试剂二	液体1.1mL×1支	4℃保存	
试剂三	液体3mL×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、水浴锅和冰。

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，了解本批样品和实验流程，避免样本和试剂浪费！

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，可按照细胞数量(10⁶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℃)或置于水浴锅(25℃)中孵育15-30min。

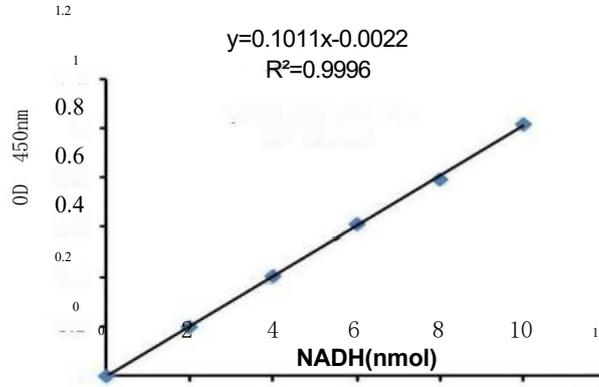
③提取液和试剂一和二和三可按照140:20:10:20比例配成混合液(一枪加190μL 该混合液)(该混合液用多少配多少，现配现用)。在96孔板中依次加入：

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 ΔA 小于0.01, 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 μL , 则提取液相应减少); 则调整后的V1 和 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 μL 样本+160 μL 提取液+20 μL 试剂一+10 μL 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 ΔA 。



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。

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

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。

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

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1nmol 乳酸转化成丙酮酸定义为一个酶活单位。

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

5、按液体体积计算：

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

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

V---加入提取液体积, 1mL;

V¹---加入样本体积, 0.01mL;

T---反应时间, 10min;

W---样本质量, g;

50---细胞或细菌总数; 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(2nmol/ μL): 向标准品EP 管里面加入0.7mL 蒸馏水(母液需在两天内用且-20 $^{\circ}\text{C}$ 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/ μL 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 按照10 μL 的各个浓度标准品+180 μL 提取液+10 μL 试剂二, 混匀后孵育10min 后于450nm 处读取终点值, 根据结果即可制作标准曲线。