

乳酸脱氢酶 (LDH) 活性检测试剂盒 (微量法)
(本试剂盒仅供科研使用)**产品包装**

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0179	乳酸脱氢酶 (LDH) 活性检测试剂盒 (微量法)	100 管/48 样

产品内容

名称	规格	储存条件
提取液	液体 60mL ×1 瓶	4℃
试剂一	液体 5mL ×1 瓶	4℃
试剂二	粉剂 ×1 支: 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℃保存, 禁止反复冻融。	-20℃
试剂三	液体 5mL ×1 瓶	4℃
试剂四	液体 20mL ×1 瓶	4℃
试剂五	液体 100μL ×1 瓶	4℃

一、产品说明

乳酸脱氢酶 (Lactate Dehydrogenase, 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。

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。

二、自备材料

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。

三、样品准备

- 1、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、细胞/细菌: 先收集细胞或细菌到离心管内, 离心后弃去上清; 按照细胞或细菌数量(10⁴ 个)加入 1mL 提取液 (建议 2000 万细菌或细胞加入 1mL 提取液), 超声波破碎 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次), 8000g, 4℃离心 10min, 取上清待测。
- 3、血浆/血清: 直接检测。

四、操作步骤

正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

- 1、酶标仪或分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 450nm, 蒸馏水调零。
- 2、样本测定 (在 EP 管中依次加入) :

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样品	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) 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) 水浴 15min。		
试剂四	150	150
充分混匀, 室温静置 15 分钟, 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。		

五、LDH 活性的计算

A. 用 96 孔板测定的计算公式如下:

1、标准曲线的建立: $y = 0.4554x + 0.0037$ (x 为标准品浓度, $\mu\text{mol/mL}$; y 为 ΔA)。

2、按照组织蛋白浓度计算

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。

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

$$= 146.4 \times (\Delta A - 0.0037) \div Cpr$$

需要另外测定, 建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

3、按照样本鲜重计算

单位的定义: 每 g 组织每分钟催化产生 1 nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

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

$$= 146.4 \times (\Delta A - 0.0037) \div W。$$

4、按照细菌/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 1 nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

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

$$= 0.073 \times (\Delta A - 0.0037)。$$

5、按照血清/血浆体积计算

单位的定义: 每 mL 血清 (浆) 每分钟催化产生 1 nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

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

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.01 mL; 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. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下:

1、标准曲线的建立: $y = 0.9108x + 0.0037$ (x 为标准品浓度, $\mu\text{mol/mL}$; y 为 ΔA)。

2、按照组织蛋白浓度计算

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。

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

需要另外测定, 建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

3、按照样本鲜重计算

单位的定义: 每 g 组织每分钟催化产生 1 nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

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

4、按照细菌/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。

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

5、按照血清/血浆体积计算

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。

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

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 :

$1\mu\text{mol/mL} = 10^3 \text{ nmol/mL}$ 。

六、注意事项

1、标准曲线线性范围为: 0.1 $\mu\text{mol/mL}$ - 2 $\mu\text{mol/mL}$ 。

2、 ΔA 线性范围为: 0.01 - 1。