

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

微量法 100 管/48 样

注 意：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℃保存；

试剂一：液体 5 mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×1 支，-20℃保存，用时加入 10 μ L 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；

试剂三：液体 5 mL×1 瓶，4℃保存；

试剂四：液体 20 mL×1 瓶，4℃保存；

试剂五：液体 100 μ L×1 支，4℃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 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℃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℃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(μ L) | 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℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）准确水浴 15min

| | | |
|-----|----|----|
| 试剂三 | 50 | 50 |
|-----|----|----|

充分混匀，37℃（哺乳动物）或 25℃（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 : $1\mu\text{mol/mL} = 10^3 \text{ nmol/mL}$ 。

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。