

乳酸脱氢酶(LDH)活性检测试剂盒说明书

Lacate Dehydrogenase Assay Kit

微量法

货号: AK141

规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES08	60ml×1 瓶	4℃保存;
AK141-A	7ml×1 瓶	4℃保存;
AK141-B	粉剂×1 支	-20℃保存, 用时加入 1.3 mL 蒸馏水充分溶解备用, 建议现配现用, 也可以小剂量分装保存, 两周内有效, 避免反复冻融;
AK141-C	7ml×1 瓶	4℃保存;
AK141-D	25ml×1 瓶	4℃保存;
AK141-标准品 (2 μmol/ml)	1ml×1 支	4℃保存。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 乳酸脱氢酶 (Lacate 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。

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。

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、水浴锅、天平、离心机、可调式移液枪、研钵、冰和蒸馏水。

粗酶液提取:

- 组织样品的制备: 按照组织质量(g): 提取液 ES08 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 ES08), 进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
- 细菌、细胞样品的制备: 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 ES08 体积(ml)为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1ml 提取液 ES08), 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。
- 血清 (浆) 样品: 直接检测。

测定步骤:

- 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。
- 制备标准品: 取适量标准品原液, 然后用蒸馏水进行倍比稀释至 1、0.5、0.25、0.125、0μmol/mL, 用 2、1、0.5、0.25、0.125、0μmol/mL 做标准曲线。
- 在 EP 管中加入下列试剂:

试剂名称	对照管(ul)	测定管(ul)	标准管(ul)
样本	10	10	
标准液			10
AK141-A	50	50	50
AK141-B		10	

蒸馏水	10		10
充分混匀, 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 准确水浴 15min			
AK141-C	50	50	50
充分混匀, 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 准确水浴 15min			
AK141-D	150	150	150
充分混匀, 室温静置 3min, 取200μL转移至微量玻璃比色皿或在96孔板中, 450nm下测定吸光度, 计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。			
注: 每个测定管需要设一个对照管。			

乳酸脱氢酶活力计算:

- 标准曲线绘制: 以标准液浓度为x轴, A标准为y轴, 绘制标准曲线, 得到标准方程, 将 ΔA 测定代入公式得到x ($\mu\text{mol/ml}$)。
 - 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。
$$\text{LDH (U/mL)} = x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T \times 10^3 = 66.7x$$
 - 细胞、细菌和组织中 LDH 活力的计算:
 - 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。
$$\text{LDH (U/mg prot)} = x \times V_{\text{样}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 = 66.7x \div \text{Cpr}$$

需要另外测定蛋白浓度, 建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒([C05-02001](#))。
 - 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。
$$\text{LDH (U/g 鲜重)} = x \times V_{\text{样}} \div (W \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 = 66.67x \times W$$
 - 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。
$$\text{LDH (U/10}^4 \text{ cell)} = x \times V_{\text{样}} \div (500 \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 = 0.133x$$
- 注:** V 样: 加入反应体系中样本体积, 0.01mL; V 样总: 加入提取液的体积, 1 mL; T: 反应时间, 15 min; Cpr: 蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500 万; 10^3 : $1\mu\text{mol/mL} = 10^3 \text{ nmol/ml}$ 。