

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

分光光度法 50 管/24 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、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液：30mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：液体 15 mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×1 支，-20℃保存，用时加入 10 μL 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 15 mL×1 瓶，4℃保存；

试剂四：液体 50 mL×1 瓶，4℃保存；

试剂五：液体 100 μL ×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 | 50 | 50 |

| | | |
|--|-----|-----|
| 试剂一 | 250 | 250 |
| 试剂二 | 50 | |
| 蒸馏水 | | 50 |
| 充分混匀, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 15min | | |
| 试剂三 | 250 | 250 |
| 充分混匀, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 15min | | |
| 试剂四 | 750 | 750 |

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。

LDH 活力单位的计算:

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, 0.05mL; 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。

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 - 2。