

乳酸脱氢酶（LDH）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：AC10187

规格：100T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 7 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂三	液体 7 mL×1 瓶	4°C保存
试剂四	液体 25 mL×1 瓶	4°C保存
标准液	液体 1 mL×1 支	4°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 1.3 mL 双蒸水充分溶解备用，配好后可分装成小管-20°C保存，可保存两周，禁止反复冻融；
- 2、标准品：2 μmol/mL 丙酮酸钠溶液。

产品说明：

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。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

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、微量玻璃比色皿/96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

操作步骤：**一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）****1. 细菌、细胞或组织样本的制备：**

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（10⁴个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液），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°C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）样本：直接检测。

二、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、标准品的制备：取100μL标准液，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。

3、样本测定

试剂名称(μL)	测定管	对照管	标准管
待测样本	10	10	-
标准液	-	-	10
试剂一	50	50	50
试剂二	10	-	-
蒸馏水	-	10	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	50
充分混匀，37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）水浴15min			
试剂四	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 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。每个测定管需要设一个对照。

三、LDH 活力单位计算

1. 标准曲线的绘制：根据标准管测定值和浓度做标准曲线，y为标准品浓度，μmol/mL；x为对吸光度（减去浓度为0的标准管的OD值）。

2. 计算样本丙酮酸的含量，即将 ΔA 带入回归方程中（x），计算y 值。

3. 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。

$$\text{LDH (U/mL)} = y \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T \times 10^3 = 66.7 \times y$$

4. 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1nmol丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{LDH (U/mg prot)} = y \times V_{\text{样}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 = 66.7 \times y \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本质量计算

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。

$$\text{LDH (U/g 质量)} = y \times V_{\text{样}} \div (W \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 = 66.67 \times y \div W$$

(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。

$$\text{LDH (U/10}^4 \text{ cell)} = y \times V_{\text{样}} \div (500 \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 = 0.133 \times y$$

V样: 反应体系中加入的样本体积, $10\mu\text{L}=0.01\text{mL}$; V样总: 加入的提取液体积, 1mL ; T: 反应时间, 15min ; 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 : $1\mu\text{mol/mL}=10^3\text{nmol/mL}$ 。

相关发表文献:

[1] Zhou F, Du J, Wang J. Albendazole inhibits HIF-1 α -dependent glycolysis and VEGF expression in non-small cell lung cancer cells[J]. Molecular and cellular biochemistry, 2017, 428(1-2): 171-178.

[2] Zhang H, Da Z, Feng Y, et al. Enhancing the electricity generation and sludge reduction of sludge microbial fuel cell with graphene oxide and reduced graphene oxide[J]. Journal of cleaner production, 2018, 186: 104-112.

[3] Zhao B, Sun L, Jiang X, et al. Genipin protects against cerebral ischemia-reperfusion injury by regulating the UCP2-SIRT3 signaling pathway[J]. European journal of pharmacology, 2019, 845: 56-64.

[4] Zhao H L, Wu B Q, Luo Y, et al. Exogenous hydrogen sulfide ameliorates high glucose-induced myocardial injury & inflammation via the C1RP-MAPK signaling pathway in H9c2 cardiac cells[J]. Life sciences, 2018, 208: 315-324.

参考文献:

[1] Huang P H, Fu L C, Huang C S, et al. The uptake of oligogalacturonide and its effect on growth inhibition, lactate dehydrogenase activity and galactin-3 release of human cancer cells[J]. Food chemistry, 2012, 132(4): 1987-1995.