

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

（微板法 96 样）

一、产品简介：

乳酸脱氢酶 LDH（EC 1.1.1.27）是一种氧化还原酶，催化丙酮酸与乳酸之间的相互转化，广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，通常测量 LDH 来评估组织或细胞的损伤状况。

本试剂盒提供一种快速、灵敏的检测方法：乳酸脱氢酶（LDH）催化乳酸和 NAD⁺ 反应生成丙酮酸和 NADH，产生的 NADH 与特异的显色剂反应，产生在 450nm 处有最大吸收峰的黄色物质，通过检测该黄色物质在 450nm 的增加速率，进而计算出乳酸脱氢酶活性的大小。

二、试剂盒的组成和配制：

| 试剂名称 | 规格 | 保存要求 | 备注 |
|------|--------------|-------|---------------|
| 提取液 | 液体 120mL×1 瓶 | 4℃ 保存 | |
| 试剂一 | 液体 2.2mL×1 瓶 | 4℃ 保存 | |
| 试剂二 | 液体 1.1mL×1 支 | 4℃ 保存 | |
| 试剂三 | 液体 3mL×1 瓶 | 4℃ 保存 | |
| 标准品 | 粉体 mg×1 支 | 4℃ 保存 | 若重新做标曲，则用到该试剂 |

【注】：粉剂量在 mg 级别，使用前用手甩几次或者进行离心，打开直接加入要求的试剂即可。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、乳酸脱氢酶（LDH）活性检测：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm，4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例提取

② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 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）；12000rpm，4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌或细胞数量（10⁴ 个）：提取液体积（mL）为 1000~5000：1 的比例进行提取

③ 液体样本：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）。

③ 在 96 孔板中依次加入：

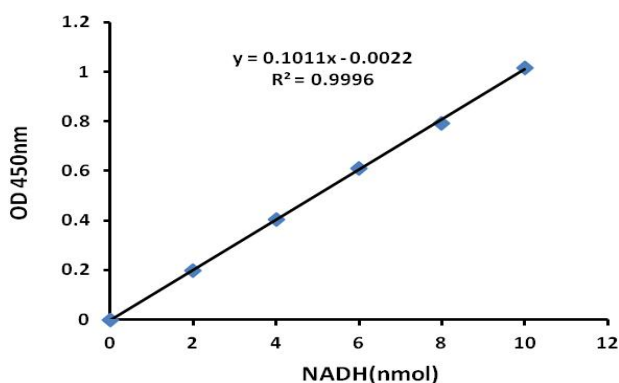
| 试剂名称（μL） | 测定管 |
|----------|-----|
| 样本 | 10 |
| 提取液 | 140 |
| 试剂一 | 20 |
| 试剂二 | 10 |

| | |
|--|----|
| 试剂三 | 20 |
| 混匀，在室温（25℃）下，立即于 450nm 处读取 A1 值，10min 后读取 A2 值， $\Delta A=A2-A1$ 。 | |

- 【注】：1. 若 ΔA 在零附近，可以延长反应时间 T（如：30min 或更长），或增加样本量 V1（如增至 40 μ L，则提取液相应减少）；则调整后加样体积 V1 和反应时间 T 需代入计算公式重新计算。
2. 若样本自身含有高浓度的还原型物质（如 VC 等），需增加一个样本自身对照：10 μ L 样本+160 μ L 提取液+20 μ L 试剂一+10 μ L 试剂二，检测同测定管， $\Delta A=（A2-A1）测定-（A2-A1）对照$ 。

五、结果计算：

1、标准曲线：y = 0.1011x - 0.0022；x 是 NADH 摩尔质量（nmol），y 是 ΔA 。



2、按样本蛋白浓度计算：

酶活性定义：每毫克组织蛋白每分钟催化 1 nmol 乳酸转化成丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$LDH \text{ (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0022) \div 0.1011] \div (V1 \times Cpr) \div T = 98.9 \times (\Delta A + 0.0022) \div Cpr$$

3、按样本鲜重计算：

酶活性定义：每克组织每分钟催化 1 nmol 乳酸转化成丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$LDH \text{ (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0022) \div 0.1011] \div (W \times V1 \div V) \div T = 98.9 \times (\Delta A + 0.0022) \div W$$

4、按细菌/细胞密度计算：

酶活性定义：每 1 万个细菌/细胞每分钟催化 1 nmol 乳酸转化成丙酮酸定义为一个酶活单位。

$$LDH \text{ (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0022) \div 0.1011] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.2 \times (\Delta A + 0.0022)$$

5、按液体体积计算：

酶活性定义：每毫升液体每分钟催化 1 nmol 乳酸转化成丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$LDH \text{ (nmol/min/mL)} = [(\Delta A + 0.0022) \div 0.1011] \div V1 \div T = 98.9 \times (\Delta A + 0.0022)$$

V：加入提取液体积，1 mL；

V1：加入样本体积，0.01mL；

T：反应时间，10min；

W：样本质量，g；

500：细胞或细菌总数；500 万；

Cpr：蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（1nmol/ μ L）：向标准品 EP 管里面加入 1.41ml 蒸馏水（母液需在两天内用且-20℃保存）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. nmol/ μ L。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。