

乳酸脱氢酶（LDH）活性检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1001

保存：-20℃避光保存 12 个月

规格：48T/48S 96T/96S

适用样本：动植物组织、细胞、血清（浆）等液体样本

产品简介

乳酸脱氢酶（LDH）是一种氧化还原酶（EC1.1.1.27），广泛存在于各种生物体中。它催化丙酮酸和乳酸相互转化，同时伴随着 NADH 和 NAD⁺的相互转化。在缺氧条件下，它将糖酵解的最终产物丙酮酸转化为乳酸。LDH 定量是有临床意义的，因为某些 LDH 同工酶的血清水平反映了特定组织中的病理条件。当疾病、伤害或有毒物质损害组织时，细胞的乳酸脱氢酶释放到血液中。由于乳酸脱氢酶是一种相当稳定的酶，因此它已被广泛用于评估组织和细胞的损伤和毒性。本试剂盒提供了一种简单、简便的微量法，用于测定动植物组织、细胞、血清（浆）和其他生物液中的乳酸脱氢酶。原理是 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，在 520 nm 处有最大吸收峰。在一定的浓度范围内，丙酮酸含量与 520 nm 吸光度成正比，根据标准曲线，可计算出样品中丙酮酸含量，进而反映 LDH 活性。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48 T	96 T	
提取液	60mL	120mL	4℃
试剂一	1mL	2mL	4℃
试剂二	1mL	2mL	-20℃
试剂三	2mL	4mL	4℃，避光保存
试剂四	8mL	16mL	4℃
丙酮酸标准品（20μmol/mL）	1mL	1mL	4℃

自备耗材

酶标仪或可见光分光光度计（能测 520nm 处的吸光度）

恒温箱、制冰机、低温离心机

96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头

去离子水

匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。

提取液：即用型；4℃保存。

试剂一：即用型；整个实验过程中，冰上放置；4℃保存。

试剂二：即用型；整个实验过程中，冰上放置；分装保存于-20℃。

试剂三：即用型；使用前，平衡到室温；4℃，避光保存。

试剂四：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

标准品制备：

产品说明书

标准曲线设置：按下表所示用提取液将 20 $\mu\text{mol/mL}$ 标准溶液稀释至 4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625 $\mu\text{mol/mL}$ 的标准液。

	标准品体积 (μL)	提取液体积 (μL)	标准品浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)
Std. 1	40 μL 20 $\mu\text{mol/mL}$	160	4
Std. 2	100 μL of Std. 1	100	2
Std. 3	100 μL of Std. 2	100	1
Std. 4	100 μL of Std. 3	100	0.5
Std. 5	100 μL of Std. 4	100	0.25
Std. 6	100 μL of Std. 5	100	0.125
Std. 7	100 μL of Std. 6	100	0.0625

注意：每次实验，请使用新配制的标准品。

样本制备

动植物组织：称取约 0.1g 样本，加入 1mL 预冷的提取液，冰浴匀浆，10,000g，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10min，取上清液，置冰上待测。

细胞：收集 500 万细胞到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，离心后弃上清，加入 1mL 提取液，冰浴超声波破碎细胞 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），然后 10,000g，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10min，取上清液，置冰上待测。

血清、血浆或其它生物学液体：可直接用来检测，或者如果有必要，建议将样本根据预实验结果用提取液稀释后再进行检测。

注意：建议使用新鲜样本。如果不立即使用，可将样品在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 下保存一个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用 BCA 蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或可见光分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 520nm，可见光分光光度计去离子水调零。
2. 提取液、试剂三和试剂四 37 $^{\circ}\text{C}$ （哺乳动物）或 25 $^{\circ}\text{C}$ （其他物种）预热 10min
3. 操作表（下述操作在 96 孔板或微量玻璃比色皿中操作）：

试剂 (μL)	空白孔	标准孔	测定孔
样本	0	0	10
标准品	0	10	0
提取液	32	22	22
试剂二	8	8	8
试剂一	10	10	10

充分混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ （哺乳动物）或 25 $^{\circ}\text{C}$ （其他物种）孵育 10min

试剂三	25	25	25
-----	----	----	----

充分混匀，室温静置 2min

试剂四	125	125	125
-----	-----	-----	-----

混匀，在 520nm 波长处测定各孔的吸光值 A。计算相对吸光值 $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 、 $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。（空白孔只需做一管）

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 $\Delta A_{\text{测}}$ 小于 0.001 可适当加大样本量。如果 ΔA 大于 2.0，样本可用提取液进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数，或减少提取用样本量。

结果计算

1. 标准曲线的绘制

以丙酮酸标准溶液浓度为 y 轴， $\Delta A_{\text{标}}$ 为 x 轴，绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。

2. LDH 含量的计算

将样本的 $\Delta A_{\text{测}}$ 代入方程得到 y 值 ($\mu\text{mol/mL}$)。

(1) 按样本鲜重计算

活性单位的定义：每 g 组织每分钟产生 1nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{LDH (U/g 鲜重)} = y \times V_{\text{反应}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 10^3 \times n = 500y \div W \times n$$

(2) 按蛋白浓度计算

活性单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟产生 1nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{LDH (U/mg 蛋白)} = y \times V_{\text{反应}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \times 10^3 \times n = 500y \div \text{Cpr} \times n$$

(3) 按样本体积计算

活性单位的定义：每 mL 液体样本每分钟产生 1nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{LDH (U/mL)} = y \times V_{\text{反应}} \div V_{\text{样}} \div T \times 10^3 \times n = 500y \times n$$

(4) 按细胞数目计算

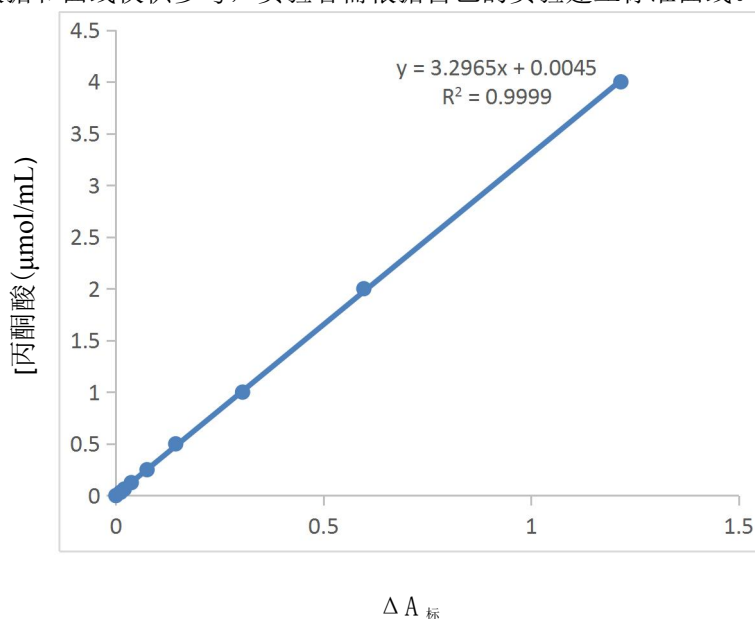
活性单位的定义：每 1 万个细胞每分钟产生 1nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

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

$V_{\text{反应}}$ ：反应体系总体积，0.05mL； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01mL； W ：样本质量，0.1g； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL； T ：反应时间，10min； 10^3 ： $1\mu\text{mol/mL} = 1 \times 10^3 \text{nmol/mL}$ ； n ：样本稀释倍数； Cpr ：样本蛋白浓度，mg/mL；500：细胞数量，500 万。

结果展示

典型标准曲线-以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

产品说明书

相关产品：

PMK1115 乳酸检测试剂盒（微量法）

PMK1116 丙酮酸（PA）检测试剂盒（微量法）

PMK1110 丙酮酸脱氢酶（PDH）检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：

