

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

（货号：ADS-W-FM003-96 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 2.2mL×1 瓶	4℃ 避光保存	
试剂二	液体 1.1mL×1 支	4℃ 避光保存	
试剂三	液体 3mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4℃ 保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

【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、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

- 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 (10^4 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、检测步骤：

- 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：

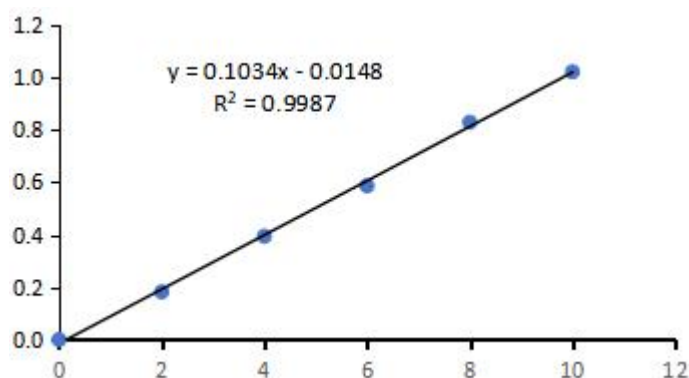
试剂组分 (μL)	测定管
样本	10

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： $y = 0.1034x - 0.0148$ ；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 (nmol/min/mg prot) = $[(\Delta A + 0.0148) \div 0.1034] \div (V1 \times Cpr) \div T = 96.7 \times (\Delta A + 0.0148) \div Cpr$

- 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 (nmol/min/g 鲜重) = $[(\Delta A + 0.0148) \div 0.1034] \div (W \times V1 \div V) \div T = 96.7 \times (\Delta A + 0.0148) \div W$

- 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力单位。

LDH (nmol/min/ 10^4 cell) = $[(\Delta A + 0.0148) \div 0.1034] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.193 \times (\Delta A + 0.0148)$

- 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 (nmol/min/mL) = $[(\Delta A + 0.0148) \div 0.1034] \div V1 \div T = 96.7 \times (\Delta A + 0.0148)$

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 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），标准品母液浓度为 1nmol/ μ L。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. nmol/ μ L。

也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

标品浓度 nmol / μ L	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μ L)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	10	
蒸馏水		10
提取液	140	140
试剂一	20	20
试剂二	10	10
试剂三	20	20
混匀，在室温 (25 $^{\circ}$ C) 下，立即于 450nm 处读取 A 值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{0 浓度管}}$ 。		