

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

分光光度法 50 管/24 样

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。