

乳酸脱氢酶(LDH)活性检测试剂盒, 分光光度计法

Lactate Dehydrogenase(LDH) Activity Detection Kit

使用说明书

◆货号及规格:

目录编号	包装规格
C226-01	48T

◆产品组成:

组分编号	试剂盒组分	储存	C226-01(48T)
C226-1	提取液	4℃	100mL
C226-2	试剂 1	4℃	4.2mL
C226-3	试剂 2	4℃	2.1mL
C226-4	试剂 3	4℃	6mL
C226-5	标准品(粉末)	4℃	1支

◆储存条件: 冰块运输, -20℃避光保存, 保质期 12 个月。

◆产品概述:

乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)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。

细胞凋亡或坏死而造成细胞膜结构的破坏会导致细胞浆内的酶释放到培养液里, 其中包括酶活性较为稳定的 LDH。通过检测从质膜破裂的细胞中释放到培养液中的 LDH 的活性, 可以实现对细胞毒性的定量分析。LDH 释放被看做细胞膜完整性的重要指标, 并被广泛用于细胞毒性检测及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。

◆使用方法:

建议正式实验前, 选取 2 个样本做预测定, 了解实验样品情况, 熟悉流程, 避免样本和试剂浪费!

一、样本准备:

1. 组织样本准备:

- a) 称取约 0.1g 组织加入研钵中, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。
- b) 12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清液, 置冰上待测。

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

2. 细菌/细胞样本准备:

- a) 收集细菌或细胞到离心管内, 离心弃上清。
- b) 取 5×10^6 个细菌或细胞加入 1mL 提取液, 冰浴超声波破碎细菌或细胞(冰浴, 强度 20%或 200W, 超声 3S, 间隔 10S, 重复 30 次)。
- c) 12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清液, 置冰上待测。

注: 若增加样本量, 可按照每 $0.5 \sim 1 \times 10^7$ 个细菌/细胞加入 1mL 提取液进行提取。

3. 液体样本准备: 澄清的液体直接检测; 若浑浊则离心后取上清检测。

二、样品测定:

1. 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 450nm, 蒸馏水调零。
2. 所有试剂解冻至室温(25°C)。
3. 在 1mL 玻璃比色皿中依次加入:

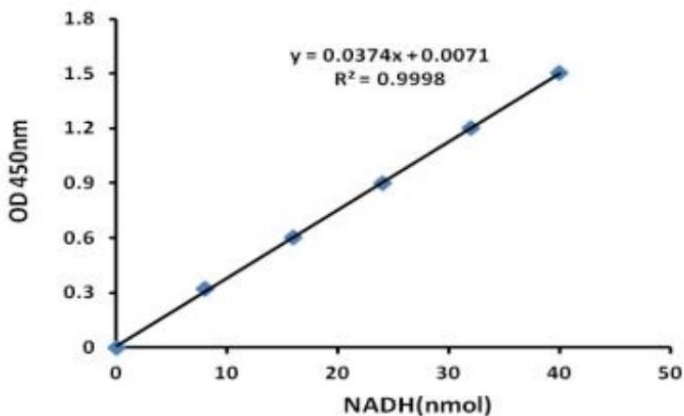
试剂名称	测定管
样本	40 μ L
提取液	560 μ L
试剂 1	80 μ L
试剂 2	40 μ L
试剂 3	80 μ L
混匀, 在室温(25°C)下, 立即于 450nm 处读取 A1 值, 10min 后读取 A2 值, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

说明:

- a) 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 80 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。
- b) 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: 40 μ L 样本 + 640 μ L 提取液 + 80 μ L 试剂 1 + 40 μ L 试剂 2, 检测同测定管, $\Delta A = (A2 - A1)_{\text{测定}} - (A2 - A1)_{\text{对照}}$ 。

三、含量计算:

1. 标准曲线: $y=0.0374x+0.0071$; x 是 NADH 摩尔质量(nmol), y 是 ΔA 。



2. 按样本蛋白浓度计算: 酶活性定义为每毫克组织蛋白每分钟催化 1nmol 乳酸转化成丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{LDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[(\Delta A-0.0071)\div 0.0374]\div(V1\times\text{Cpr})\div T=66.9\times(\Delta A-0.0071)\div\text{Cpr}$$

3. 按样本鲜重计算: 酶活性定义为每克组织每分钟催化 1nmol 乳酸转化成丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{LDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[(\Delta A-0.0071)\div 0.0374]\div(W\times V1\div V)\div T=66.9\times(\Delta A-0.0071)\div W$$

4. 按细菌/细胞密度计算: 酶活性定义为每 1 万个细菌/细胞每分钟催化 1nmol 乳酸转化成丙酮酸定义为一个酶活单位。

$$\text{LDH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell})=[(\Delta A-0.0071)\div 0.0374]\div(500\times V1\div V)\div T=0.134\times(\Delta A-0.0071)$$

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

$$\text{LDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL})=[(\Delta A-0.0071)\div 0.0374]\div V1\div T=66.9\times(\Delta A-0.0071)$$

注: 计算公式说明

- V: 加入提取液体积(1mL)
- V1: 加入样本体积(0.04mL)
- 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)

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°C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。

◆**注意事项:**

1. 若重新做标准曲线, 则用到组分 C226-5/标准品(粉末)。
2. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. 本产品仅限于专业人员科学研究使用, 不得用于临床诊断和药品等用途。

=====

