

乳酸脱氢酶（LDH） 检测试剂盒

货号：RBC0015

规格：86S

检测范围：78.125-2500 nmol/mL

检测波长：520nm（酶标仪）

检测时间：15min

适用样本：动植物组织、细胞、血清（浆）等液体样本

使用前请仔细阅读说明书，预实验后再进行批量试验

如有任何问题，可以通过以下方式联系我们：

销售部电话：027-65316809

技术部电话：153-42250750

官方网站：www.reedbio.cn

一、实验原理：

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。

二、试剂盒组分与保存（试剂盒保质期 6 个月）

试剂名称	规格	保存条件
提取液	120mL	4°C
试剂一	1mL	4°C
试剂二	1mL	-20°C
试剂三	2.5mL	4°C避光
试剂四	12.5mL	4°C
丙酮酸标准品（20μmol/mL）	1mL	4°C
酶标板	96T:8 孔×12 条	常温保存

三、需自备的仪器和用品：

酶标仪(**520nm**)、恒温箱、制冰机、低温离心机、、可调节式移液枪及枪头
去离子水、匀浆器（如果是组织样本）

样本制备参考附录

四、操作步骤：

1. 预实验注意事项：

- 1) 实验之前建议选择 2 个预期差异大的样本和标准曲线（S1-S7）做预实验，一共 9 个孔，**正式实验无需重新做标曲**。
- 2) 若预实验测定吸光值超出标准吸光值线性范围，样本可用**提取液**进一步稀释，避免实验样本和试剂浪费！
- 3) 预实验仅需比较样本 OD 值是否在标准曲线内，因此预实验无需测空白孔，**正式实验要测空白孔**。

2. 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。

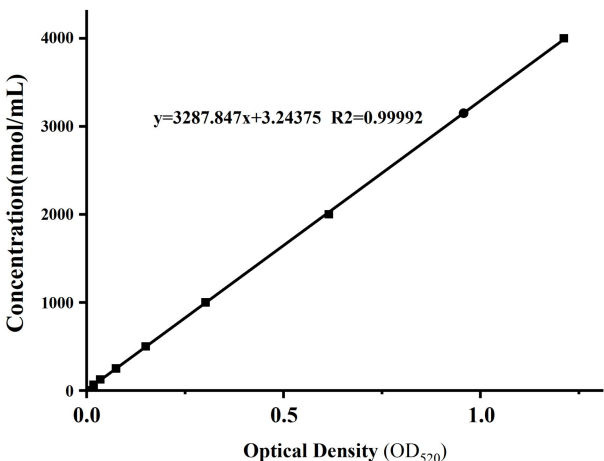
3. **标准溶液**的配制：**20μmol/mL** 标准品母液，即 20000 nmol/mL 记为 **S0**。把 S0 用**提取液**稀释成 4000(**S1**)、2000(**S2**)、1000(**S3**)、500(**S4**)、250(**S5**)、125(**S6**)、62.5(**S7**)nmol/mL 的标准溶液备用。

编号	稀释液体积(μL)	标准液体积(μL)	稀释后浓度 (nmol/mL)
S1	40 μL S0	160	4000
S2	100μL S1	100	2000
S3	100μL S2	100	1000
S4	100μL S3	100	500
S5	100μL S4	100	250
S6	100μL S5	100	125
S7	100μL S6	100	62.5

4. 实验步骤及结果计算：

- 1) 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 **520 nm**。
- 2) 提取液、试剂三和试剂四 37℃ 预热 10min

3) 操作表：

试剂名称（μL）	空白孔	标准孔	测定孔
样本	0	0	10
标准品(S1-S7)	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℃（哺乳动物）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 $\Delta A_{\text{测}}=A_{\text{测定}}-A_{\text{空白}}$ 、 $\Delta A_{\text{标}}=A_{\text{标准}}-A_{\text{空白}}$ 。空白孔只需测一孔			
以丙酮酸标准溶液浓度为 y 轴， ΔA 标为 x 轴，绘制标准曲线(浓度为 y 轴更方便计算结果)。			
不同检测条件下，实际读数因标准品的配制、检测仪器等不同而存在差异，图中数据仅供参考！			

4) LDH 含量的计算

将样本的 ΔA 测代入方程得到 y 值 (nmol/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。LDH (U/g 鲜重) = $y \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times n = 500y \div W \times n$

(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。LDH (U/mg 蛋白) = $y \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times n = 500y \div C_{\text{pr}} \times n$

(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。LDH (U/mL) = $y \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \times n = 500y \times n$

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

$V_{\text{反总}}$ ：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；

n ：样本稀释倍数；

C_{pr} ：样本蛋白浓度，mg/mL；

500：细胞数量，500 万。

附录（样本处理）：

1. 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℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

2. 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℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

3. 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。

技术资源

微信扫描左下二维码，获得更详细的实验指南和常规问题分析如有任何技术问题，请与我司联系(建议及时对显色结果拍照，保留实验数据以及未使用的试剂)。

