

乳酸脱氢酶（LDH）检测试剂盒（微量法）

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

试剂组成和配制：

提取液：液体 60mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：液体 5 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 5 mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂四：液体 20 mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂五：液体 100 μL ×1 支，4℃ 保存；

粗酶液提取：

- 组织：**按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一）进行冰浴匀浆，4℃、8000g 离心 10min，取上清液待测。
- 细菌或细胞：**按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：试剂一体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后 8000g，4℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。
- 血液可直接测定，或者适当稀释后测定。

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:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	10	10
试剂一	50	50
试剂二	10	
蒸馏水		10

充分混匀, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其他物种) 准确水浴 15 min

试剂三	50	50
-----	----	----

充分混匀, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其他物种) 准确水浴 15 min

试剂四	150	150
-----	-----	-----

充分混匀, 室温静置 15min, 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:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、标准条件下测定的回归曲线

$$y = 0.9108x + 0.0037 \quad (x \text{ 为标准品浓度, } \mu\text{mol/mL}; y \text{ 为 } \Delta A)。$$

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, 0.01mL;

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;

10^3 : 1umol/mL= 10^3 nmol/mL。

b.使用 96 孔板测定的计算公式如下:

1、标准条件下测定的回归曲线

$$y = 0.4554x + 0.0037 \quad (x \text{ 为标准品浓度, umol/mL; } y \text{ 为 } \Delta A)。$$

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。

$$\text{LDH (nmol/min/mL)} = (\Delta A - 0.0037) \div 0.4554 \div T \times 10^3 = 146.4 \times (\Delta A - 0.0037)$$

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。

$$\text{LDH (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A - 0.0037) \div 0.4554 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \times 10^3$$

$$= 146.4 \times (\Delta A - 0.0037) \div \text{Cpr}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{LDH (nmol/min/g 鲜重)} &= [(\Delta A - 0.0037) \div 0.4554 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) \div T \times 10^3 \\ &= 146.4 \times (\Delta A - 0.0037) \div W \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{LDH (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A - 0.0037) \div 0.4554 \times V1] \div (2000 \times V1 \div V2) \div T \times 10^3 \\ &= 0.073 \times (\Delta A - 0.0037) \end{aligned}$$

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.01mL;

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;

10^3 : $1\mu\text{mol/mL} = 10^3 \text{ nmol/mL}$ 。

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 - 1