（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-K766-M

产品规格：48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器：酶标仪(450 nm)

Elabscience®乳酸脱氢酶(LDH)比色法测试盒 (WST-8 法)

Lactate Dehydrogenase (LDH) Activity Assay Kit (WST-8 Method)

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100
邮箱：biochemical@elabscience.cn
网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测动物组织样本、血清(浆)、胸水、细胞及细胞上清样本中乳酸脱氢酶的活性。

检测原理

乳酸脱氢酶催化乳酸和 NAD^+反应产生丙酮酸和 NADH，NADH 在 PMS 作用下，将电子传递给 WST-8，生产黄色的产物，其在 450 nm 有特征吸收峰。

本试剂盒测定组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法(货号：E-BC-K318-M)。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	裂解液 (Lysis Solution)	60 mL × 1 瓶	60 mL × 2 瓶	-20ºC 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	1.5 mL × 1 支	1.5 mL × 2 支	-20ºC 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	显色剂 (Chromogenic Agent)	1.5 mL × 1 支	1.5 mL × 2 支	-20ºC 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	辅酶 (Coenzyme)	粉剂 ×1 支	粉剂 ×1 支	-20ºC 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	终止剂 (Stop Solution)	3 mL × 1 瓶	6 mL × 1 瓶	-20ºC 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	NADH 标准品 (NADH Standard)	粉剂 ×1 支	粉剂 ×1 支	-20ºC 保存 6 个月
	96 孔酶标板	48 孔×1 块	96 孔×1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(450 m)

试剂准备

① 检测前，所有试剂需平衡至室温，试剂五可提前放至37℃恒温箱中20 min，待其完全澄清后方可使用。

② 试剂四工作液的配制：

取一支试剂四粉剂用 0.26 mL 双蒸水充分溶解，临用前配制，-20℃避光可保存 7 天。

③ 反应工作液的配制：

按试剂二：试剂三：试剂四工作液=12：12：1 的体积比混匀，实验前按需现配现用，避光保存。

④ 5 mmol/L标准品的配制：

取一支标准品粉剂用 2 mL 的双蒸水充分溶解，混合均匀，临用前配制，-20℃避光可保存 7 天。

⑤ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(μmol/L)	**0**	**50**	**100**	**150**	**200**	**250**	**300**	**400**
5 mmol/L NADH 标准品(μL)	0	10	20	30	40	50	60	80
试剂一(μL)	1000	990	980	970	960	950	940	920

样本准备

① 样本处理

血清(浆)样本：直接测定。

组织样本：匀浆介质为试剂一，离心取上清测定，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

细胞样本：取收集好的细胞 1×10^6 加入 0.4 mL 试剂一，混匀后放置在冰盒上，间隔 5 min 混匀一次，在冰上裂解 10 min； 4℃，15000 × g 离心 10 min，取上清待测，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.11-39.9 U/L，可参考下表进行稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
人血清	10-20	10%大鼠脾组织	150-250
狗血清	10-20	10%小鼠肝组织	250-350
小鼠血清	50-100	10%大鼠肾组织	250-350
食蟹猴血清	10-20	10%大鼠肺组织	250-350

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

① 试剂一取用时应倒出部分，再取用，避免试剂污染。

② 样本加入板孔中时应触底加入。

操作步骤

① 标准孔：取 50 μL 不同浓度标准品，加入到酶标板对应的标准孔中。
测定孔：取 50 μL 待测样本，加入到酶标板对应的测定孔中。

② 向步骤①各孔中加入 50 μL 反应工作液。

③ 37°C 恒温箱中准确孵育 10 min。

④ 孵育结束后，向步骤③酶标板各孔中加入 50 μL 的试剂五。

⑤ 酶标仪上振板 5 s，于波长 450 nm 处测定各孔 OD 值。

操作表

	标准孔	**测定孔**
待测样本(μL)	--	50
不同浓度标准品(μL)	50	--
反应工作液(μL)	50	50
37℃恒温箱中准确孵育 10 min。		
试剂五(μL)	50	50
酶标仪上振板 5 s，于波长 450 nm 处测定各孔 OD 值。		

本试剂盒检测组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

液体样本中 LDH 活力的计算：

定义：37°C 条件下，每升液体样本每分钟催化底物产生 1 μmol 的 NADH 所需要的酶量为一个活力单位。

$$\text{LDH 活力 (U/L)} = (\Delta A_{450} - b) \div a \div T \times f$$

组织和细胞样本中 LDH 活力的计算：

定义：37°C 条件下，每克组织蛋白或细胞蛋白每分钟催化底物产生 1 μmol 的 NADH 所需要的酶量为一个活力单位。

$$\text{LDH 活力 (U/gprot)} = (\Delta A_{450} - b) \div a \div T \times f \div C_{pr}$$

注解：

y：标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 的 OD 值)

x：吸光度对应的浓度

a：标准曲线斜率

b：标准曲线截距

ΔA_{450}：波长 450 nm 处测定孔的绝对 OD 值

f：加入检测体系前样本的稀释倍数

T：反应时间：10 min

C_{pr}：加入检测体系前样本的蛋白浓度(gprot/L)

附录1 关键数据

1. 技术参数

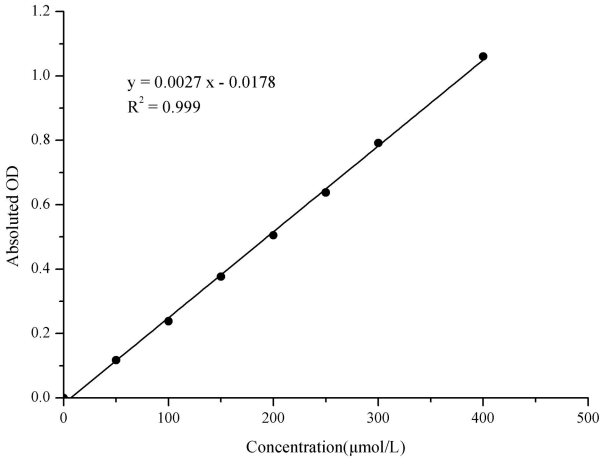
检测范围	0.11-39.9 U/L	**平均批间差**	2.3 %
灵敏度	0.11 U/L	**平均批内差**	2.3 %

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品加样量50 μL，按照操作步骤进行实验，读取各点OD值如下表所示：

标准品浓度 (μmol/L)	**0**	**50**	**100**	**150**	**200**	**250**	**300**	**400**
OD 值	0.053	0.169	0.292	0.426	0.560	0.691	0.845	1.104
	0.054	0.172	0.292	0.435	0.557	0.692	0.845	1.124
平均 OD 值	0.054	0.171	0.292	0.430	0.559	0.691	0.845	1.114
绝对 OD 值	0.000	0.117	0.238	0.377	0.505	0.638	0.792	1.061

②按上表数据绘制标准曲线，如下图所示：



附录2 实例分析

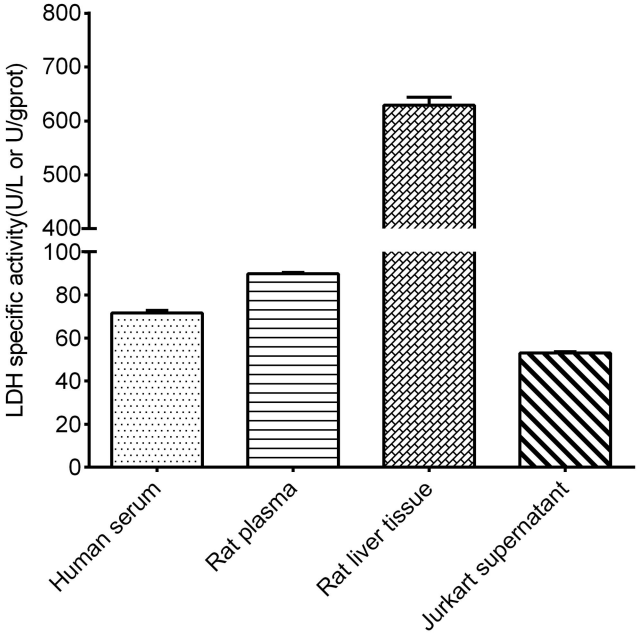
例如检测人血清(数据仅供参考)：

取稀释10倍的人血清50 μL，按操作表检测，结果如下：

标准曲线：y = 0.0027 x - 0.0178，空白孔的平均OD值为0.054，测定孔的平均OD值为0.229，计算结果为：

$$\text{LDH 活性 (U/L)} = (0.229 - 0.054 + 0.0178) \div 0.0027 \div 10 \times 10 = 71.4\ \text{U/L}$$

按照说明书，测定人血清(稀释10倍，加样量50 μL)、大鼠血浆(稀释10倍，加样量50 μL)、大鼠肾组织(10%组织匀浆蛋白浓度为14.62 gprot/L，稀释250倍，加样量50 μL)和Jurkart细胞上清(稀释3倍，加样量50 μL)中的LDH活性(如下图)：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样品本底颜色较深影响测定	若样本 LDH 含量较高，可继续稀释样本至本底颜色不影响测定为止。	样品本底颜色较深影响测定
	若样本 LDH 含量较低，可设置对照孔，扣除本底干扰。	严格按照说明书进行试剂准备

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

附录4 客户发表文献

1. Su P , Mao X , Ma J ,et al.ERRα promotes glycolytic metabolism and targets the NLRP3/caspase-1/GSDMD pathway to regulate pyroptosis in endometrial cancer[J].Journal of Experimental & Clinical Cancer Research (17569966), 2023, 42(1).DOI:10.1186/s13046-023-02834-7.

2. Zhou Y , Du T , Yang C L ,et al.Extracellular vesicles encapsulated with caspase-1 inhibitor ameliorate experimental autoimmune myasthenia gravis through targeting macrophages[J].Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society, 2023:364.DOI:10.1016/j.jconrel.2023.11.006.

3. Liang L , Peng W , Qin A ,et al.Intracellularly Synthesized Artificial Exosome Treats Acute Lung Injury[J].ACS Nano, 2024, 18(32):15.DOI:10.1021/acsnano.4c01900.

4. Malla A , Gupta S , Sur R .Inhibition of lactate dehydrogenase A by diclofenac sodium induces apoptosis in HeLa cells through activation of AMPK[J].FEBS Journal, 2024, 291(16):25.DOI:10.1111/febs.17158.

5. Liu F , Lv L F , Bi F F ,et al.ITFG2 as a NEDD4-2 inhibitor: Preserving calcium homeostasis to prevent myocardial ischemic injury[J].Biochemical Pharmacology, 2024, 230.DOI:10.1016/j.bcp.2024.116597.

6. Wang H , Liang J , Wang Y ,et al.Exploring the effects of naringin on oxidative stress-impaired osteogenic differentiation via the Wnt/β-catenin and PI3K/Akt pathways[J].Scientific Reports.DOI:10.1038/s41598-024-64952-2.

7. Xia Y , Zhou H , Ou J S ,et al.The Potential of a New Natural Vessel Source: Decellularized Intercostal Arteries as Sufficiently Long Small-Diameter Vascular Grafts[J].Bioengineering (Basel), 2024, 11(7).DOI:10.3390/bioengineering11070700.

8. Ma L ,Li Ma Li MaSchool of Design, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai , People's Republic of ChinaR&D Center for Aromatic Plants, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai , People's Republic of ChinaMore by Li Ma,,et al.Artemisia sieversiana Ehrhart ex Willd. Essential Oil and Its Main Component, Chamazulene: Their Photoprotective Effect against UVB-Induced Cellular Damage and Potential as Novel Natural Sunscreen Additives[J].ACS

Sustainable Chemistry & Engineering, 2023(50):11.