

(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	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	1.5 mL × 1 支	1.5 mL × 2 支	-20°C 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	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	辅酶 (Coenzyme)	粉剂 × 1 支	粉剂 × 1 支	-20°C 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	终止剂 (Stop Solution)	3 mL × 1 瓶	6 mL × 1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	NADH 标准品 (NADH Standard)	粉剂 × 1 支	粉剂 × 1 支	-20°C 保存 6 个月
	96 孔酶标板	1 板		
	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($\mu\text{mol/L}$)	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°C，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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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℃ 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℃ 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

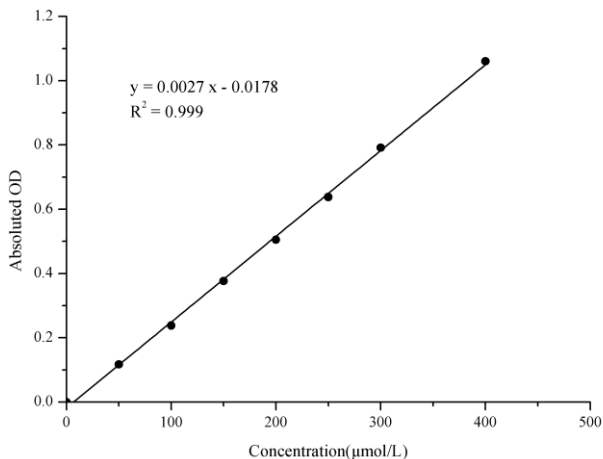
检测范围	0.11-39.9 U/L	平均批间差	2.3 %
灵敏度	0.11 U/L	平均批内差	2.3 %

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 ($\mu\text{mol/L}$)	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

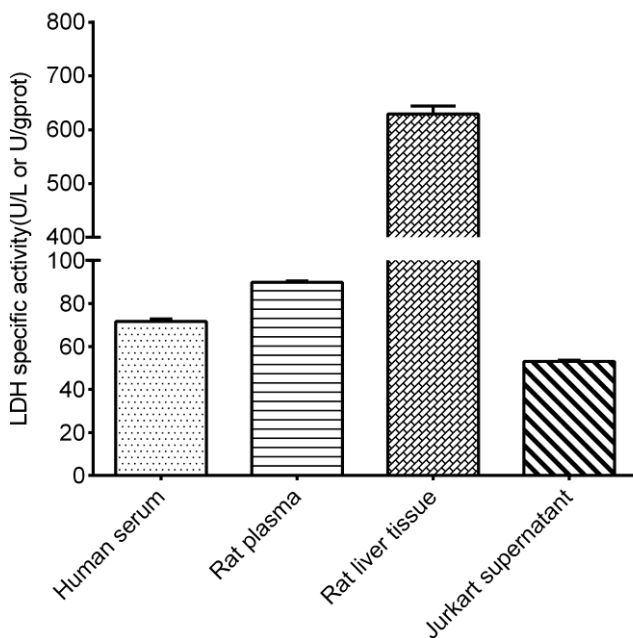
例如检测人血清(数据仅供参考):

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: $y = 0.0027x - 0.0178$, 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. Zhang X, He C, Chen Y, et al. Cyclic reactions-mediated self-supply of H₂O₂ and O₂ for cooperative chemodynamic/starvation cancer therapy[J]. *Biomaterials*, 2021, 275:120987-. IF:12.479
2. Xia H, Scholtes C, Dufour CR, et al. Insulin action and resistance are dependent on a GSK3 β -FBXW7-ERR α transcriptional axis. *Nat Commun.* 2022; 13 (1):2105. IF:14.919
3. Liu Q, Zhang T X, Zheng Y D, et al. Calixarene-Embedded Nanoparticles for Interference-Free Gene-Drug Combination Cancer Therapy[J]. *Small*, 2021, 2006223. IF:11.459
4. He C, Zhang X, Chen C, et al. A solid lipid coated calcium peroxide nanocarrier enables combined cancer chemo/chemodynamic therapy with O₂/H₂O₂ self-sufficiency[J]. *Acta Biomaterialia*, 2021, 122. IF:8.203
5. Chen L, Tao F, Zhang Y, et al. Islet-cell autoantigen 69 accelerates liver regeneration by downregulating Tgfb1 and attenuating Tgf β signaling in mice[J]. *FEBS Letters*, 2020, 594(17). IF:6.665
6. Omar N, Frank J, Kruger J, et al. Effects of High Intakes of Fructose and Galactose, with or Without Added Fructooligosaccharides, on Metabolic Factors, Inflammation, and Gut Integrity in a Rat Model[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2021:2001133. IF:5.914
7. Wang C, Ma C, Fu K, et al. Phillygenin Attenuates Carbon Tetrachloride-Induced Liver Fibrosis via Modulating Inflammation and Gut Microbiota[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 9, 21. IF:5.81
8. Du Y Q, Zheng Y Z, Yu C X M, et al. The Mechanisms of Yu Ping Feng San in Tracking the Cisplatin-Resistance by Regulating ATP-Binding Cassette Transporter and Glutathione S-Transferase in Lung Cancer Cells[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021; 12: 678126. IF:5.81
9. Zeng X Peng, Wang L J, Guo L H, et al. Dasatinib ameliorates chronic pancreatitis induced by caerulein via anti- fibrotic and anti-inflammatory mechanism[J]. *Pharmacological Research*, 2019, 147, 104357. IF:5.574
10. Cao X, Liang Y, Liu R, et al. Uncovering the Pharmacological Mechanisms of Gexia-Zhuyu Formula (GXZY) in Treating Liver Cirrhosis by an Integrative Pharmacology Strategy. *Front Pharmacol.* 2022; 13:793888. IF:5.331
11. Wang Y, Xie W, Feng Y, et al. Epithelial-derived exosomes promote M2 macrophage

- polarization via Notch2/SOCS1 during mechanical ventilation. *Int J Mol Med.* 2022; 50 (1). IF:5.314
12. Jung D S, Son Y J, Shin J M, et al. Gymnaster Koraiensis Extract Alleviated Metabolic Syndrome Symptoms and Stimulated UCP1-Independent Energy Consumption via AMPK Activation in White Adipose Tissue[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2020. IF:5.309
 13. Ali A K, Komal A K, Almutairi S M, et al. Natural killer cell-derived IL-10 prevents liver damage during sustained murine cytomegalovirus infection[J]. *Frontiers in immunology*, 2019, 10: 2688. IF:5.085
 14. Xu Y , Zhang Y , Xu Y , et al. Activation of CD137 signaling promotes macrophage apoptosis dependent on p38 MAPK pathway-mediated mitochondrial fission[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2021 Jul;136:106003. IF:5.085
 15. Naseh A, Shirin B, Maryam M, et al. Attenuation of chronic arsenic neurotoxicity via melatonin in male offspring of maternal rats exposed to arsenic during conception: Involvement of oxidative DNA damage and inflammatory signaling cascades[J]. *Life Sciences* 266 (2021) 118876. IF:5.037
 16. Ahmed A E, Alshehri A, Al-Kahtani M A, et al. Vitamin E and selenium administration synergistically mitigates ivermectin and doramectin-induced testicular dysfunction in male Wistar albino rats[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 124: 109841. IF:4.545
 17. Su S, Tian H, Jia X, et al. Mechanistic insights into the effects of SREBP1c on hepatic stellate cell and liver fibrosis[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020. IF:4.486
 18. Wang L J, He L, Hao L, et al. Isoliquiritigenin ameliorates caerulein-induced chronic pancreatitis by inhibiting the activation of PSCs and pancreatic infiltration of macrophages[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020. IF:4.486
 19. Dejan Lazić, Andreas Scheurer, Dušan Čočić, et al. New bis-pyrazolopyridine ruthenium(III) complex as a potential anticancer drug: In vitro and in vivo activity in murine colon cancer[J]. *Dalton Transactions*, 2021 Jun; 50(22):7686-7704. IF:4.39
 20. Li X, Lv Z, Chen J, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* B10 can alleviate liver apoptosis and oxidative stress induced by aflatoxin B1[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2021, 151:112124. IF:4.06
 21. Amany Abdel-Rahman Mohamed , Safaa I. Khater , Ahmed Hamed Arisha , et al. Chitosan-stabilized selenium nanoparticles alleviate cardio-hepatic damage in type 2

- diabetes mellitus model via regulation of caspase, Bax/Bcl-2, and Fas/FasL-pathway[J]. *Gene*, 2020, 768(7):145288. IF:3.688
22. Zhang S, Jiang L, Hu H, et al. Pretreatment of exosomes derived from hUCMSCs with TNF- α ameliorates acute liver failure by inhibiting the activation of NLRP3 in macrophage[J]. *Life Sciences*, 2020, 246: 117401. IF:3.647
 23. Yu H, Zhang L, Chen P, et al. Dietary bile acids enhance growth, and alleviate hepatic fibrosis induced by a high starch diet via AKT/FOXO1 and cAMP/AMPK/SREBP1 pathway in *Micropterus salmoides*[J]. *Frontiers in Physiology*, 2019, 10. IF:3.367
 24. Sohini Sen, Shaunak Ghosh, Sayantan De, et al. Immunomodulatory and antimicrobial non-mulberry *Antheraea mylitta* silk fibroin accelerates in vitro fibroblast repair and regeneration by protecting oxidative stress[J]. *RSC Advances*, 2021 May; 11(31):19265-19282. IF:3.361
 25. Li Jianda, Yuan Chen, Liu Peng et al. Red blood cells serve as a vehicle for PEDV transmission.[J]. *Vet Microbiol*, 2021, 257: 109081. IF:3.293
 26. Chen L, Tao F, Zhang Y, et al. Islet-cell autoantigen 69 accelerates liver regeneration by downregulating *Tgfb1* and attenuating *Tgfb* signaling in mice[J]. *FEBS Letters*, 2020. IF:3.057
 27. Cui Y, Wang Y, Liu G. Protective Effect of Barbaloin in a Rat Model of Myocardial Ischemia Reperfusion Injury Through the Regulation of the CNPY2?PERK Pathway[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2019. IF:2.928
 28. Sun Yan-Chun, Han Shi-Cheng, Yao Ming-Zhu, et al. High-throughput metabolomics method based on liquid chromatography-mass spectrometry: Insights into the underlying mechanisms of salinity-alkalinity exposure-induced metabolites changes in *Barbus capito*[J]. *Journal of Separation Science*, 2021 Jan; 44(2):497-512. IF:2.878
 29. Mustafa H N, Hegazy G A, El Awdan S A, et al. Liver ischemia/reperfusion injury, a setting in which the functional mass is reduced and the role of PDE5 inhibitor[J]. *Eur. J. Anat*, 2019, 23(5): 325-332. IF:2.638
 30. Chen L, Ma K, Fan H, et al. Exogenous hydrogen sulfide protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by inhibiting endoplasmic reticulum stress and cell apoptosis.[J]. *Spandidos Publications*, 2021(2). IF:2.447