

(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-K046-S**

**产品规格：100 assays(43 samples)**

**检测仪器：紫外-可见光分光光度计(450 nm)**

## **Elabscience®乳酸脱氢酶 (LDH) 比色法测试盒**

### **Lactate Dehydrogenase (LDH) Activity Assay Kit**

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](mailto:biochemical@elabscience.cn)

网址：[www.elabscience.cn](http://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血清、血浆、组织、细胞等样本中 LDH 活力。

## 检测原理

以辅酶 I 为递氢体，LDH 催化乳酸产生丙酮酸，丙酮酸与 2,4-二硝基苯肼作用生成丙酮酸二硝基苯腙，后者在碱性溶液中呈棕红色，颜色的深浅与丙酮酸的浓度呈正比，通过测定 OD 值，可计算 LDH 的活力。

本试剂盒测组织与细胞样本时，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(Size)<br>(100 assays) | 保存方式<br>(Storage) |
|--------------------|--|--------------------------|-------------------|
| 试剂一<br>(Reagent 1) | 基质液<br>(Substrate Buffer)                                | 30 mL×1 瓶                | 2-8℃<br>保存 6 个月   |
| 试剂二<br>(Reagent 2) | 辅酶 I<br>(Coenzyme I)                                     | 粉剂×1 瓶                   | 2-8℃<br>保存 6 个月   |
| 试剂三<br>(Reagent 3) | 显色剂<br>(Chromogenic Agent)                               | 30 mL×1 瓶                | 2-8℃避光<br>保存 6 个月 |
| 试剂四<br>(Reagent 4) | 碱溶液<br>(Alkali Reagent)                                  | 30 mL×1 瓶                | 2-8℃<br>保存 6 个月   |
| 试剂五<br>(Reagent 5) | 2 μmol/mL 丙酮酸标准品<br>(2 μmol/mL Pyruvic Acid<br>Standard) | 5 mL×1 瓶                 | 2-8℃<br>保存 6 个月   |

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：紫外-可见分光光度计(450 nm)、低温离心机。

## 试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温(试剂二除外)。

② 试剂二工作液的配制：

取试剂二置于冰盒上，每一瓶粉剂加6.65 mL双蒸水溶解，混匀，2-8℃可保存15天。如需多次检测，可分装后-20℃保存1个月。

③ 试剂四工作液的配制：

按试剂四：双蒸水为1:9的体积比混匀即可，现用现配，2-8℃可保存7天。

④ 不同浓度标准品的稀释：

| 编号  | ①    | ②    | ③   | ④   | ⑤   | ⑥   | ⑦   |
|---|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 标准品浓度( $\mu\text{mol/mL}$ )               | 0    | 0.05 | 0.1 | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 |
| 2 $\mu\text{mol/mL}$ 标准品( $\mu\text{L}$ ) | 0    | 25   | 50  | 100 | 200 | 300 | 400 |
| 双蒸水( $\mu\text{L}$ )                      | 1000 | 975  | 950 | 900 | 800 | 700 | 600 |

## 样本准备

### ① 样本处理

样本要求：血清样本中不能有溶血，因为红细胞内的 LDH 活力较血清内高约 100 倍；样本中不能含有 SDS、Tween20、NP-40、Triton X-100 等去污剂；不能使用草酸盐抗凝。（草酸盐会抑制 LDH 活力）

血清血浆等液体样本：直接测定。

组织样本：组织处理的匀浆介质为生理盐水(0.9% NaCl)或 PBS(0.01 M, pH 7.4)。匀浆后，4℃，10000 ×g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。留取部分上清用于蛋白浓度测定。

细胞样本：取约 10<sup>6</sup> 个细胞加入 300-500 μL 生理盐水(0.9% NaCl)或 PBS (0.01 M, pH 7.4) 匀浆。匀浆后，4℃，10000 ×g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。留取部分上清用于蛋白浓度测定。

### 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：4-400 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

| 样本       | 稀释倍数     | 样本       | 稀释倍数    |
|----------|----------|----------|---------|
| 人血清      | 10-15    | 大鼠血清     | 20-30   |
| 人血浆      | 10-15    | 大鼠血浆     | 20-30   |
| 猪血清      | 20-30    | 10%小鼠肾组织 | 500-800 |
| 10%大鼠肝组织 | 800-1000 | 10%大鼠肺组织 | 300-500 |

注：稀释液为生理盐水(0.9% NaCl)或 PBS (0.01 M, pH 7.4)。

## 实验关键点

- ① 加试剂二工作液时，将枪头伸入反应液中反复吸打几次，并注意更换枪头。
- ② 加入试剂四工作液后，用涡旋仪进行混匀，室温静置 5 min 后，立刻测定 OD 值。

## 操作步骤

- ① 标准管：取 50  $\mu\text{L}$  双蒸水和 200  $\mu\text{L}$  不同浓度的标准品溶液加入 5 mL EP 管中；  
测定管：取 200  $\mu\text{L}$  待测样本加入到 5 mL EP 管中；  
对照管：取 50  $\mu\text{L}$  双蒸水和 200  $\mu\text{L}$  待测样本加入 5 mL EP 管中。
- ② 向步骤①中的各管加入 250  $\mu\text{L}$  试剂一。
- ③ 向步骤②中的测定管加入 50  $\mu\text{L}$  试剂二工作液。
- ④ 涡旋混匀，37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min。
- ⑤ 向步骤④中的各管加入 250  $\mu\text{L}$  试剂三，涡旋混匀，37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min。
- ⑥ 向步骤⑤中的各管加入 2.5 mL 试剂四工作液。
- ⑦ 涡旋混匀，室温静置 5 min，紫外分光光度计波长调为 450 nm，1 cm 光径石英比色皿，双蒸水调零后，测定 OD 值。

## 操作表

|  | 标准管 | 测定管 | 对照管 |
|--|-----|-----|-----|
| 双蒸水 ( $\mu\text{L}$ )  | 50  |     | 50  |
| 不同浓度标准品 ( $\mu\text{L}$ )                                      | 200 |     |     |
| 待测样本 ( $\mu\text{L}$ )   |     | 200 | 200 |
| 试剂一 ( $\mu\text{L}$ )  | 250 | 250 | 250 |
| 试剂二工作液 ( $\mu\text{L}$ )                                       |     | 50  |     |
| 涡旋混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min                           |     |     |     |
| 试剂三 ( $\mu\text{L}$ )  | 250 | 250 | 250 |
| 涡旋混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min                           |     |     |     |
| 试剂四工作液 (mL)  | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| 涡旋混匀，室温静置 5 min，紫外分光光度计波长调为 450 nm，1 cm 光径石英比色皿，双蒸水调零后，测定 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 BCA 法(货号：E-BC-K318-M)。

## 结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

血清、血浆样本：

定义：37℃条件下，每升样本与基质作用 15 min，在反应体系中产生 1μmol 丙酮酸为 1 个 LDH 活力单位(U)。

$$\text{LDH 活力 (U/L)} = (\Delta A_{450} - b) \div a \times f \times 1000^*$$

动物组织、细胞样本：

定义：37℃条件下，每克组织蛋白与基质作用 15 min，在反应体系中产生 1 μmol 丙酮酸为 1 个 LDH 活力单位(U)。

$$\text{LDH 活力 (U/gprot)} = (\Delta A_{450} - b) \div a \times f \div C_{pr} \times 1000^*$$

### 注解：

y: 标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 的 OD 值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

$\Delta A_{450}$ : 测定管 OD 值-对照管 OD 值

f: 待测样本加入检测体系之前的稀释倍数

$C_{pr}$ : 待测样本的蛋白浓度(gprot/L)

1000\*: 单位换算 1 L=1000 mL

## 附录1 关键数据

### 1. 技术参数

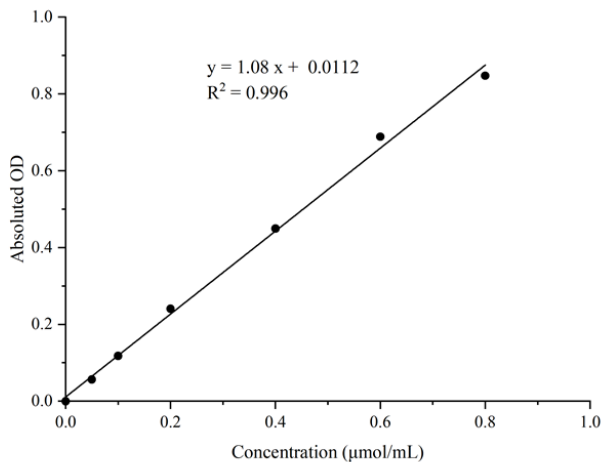
|      |           |       |       |
|------|-----------|-------|-------|
| 检测范围 | 4-400 U/L | 平均批间差 | 7.2 % |
| 灵敏度  | 4 U/L     | 平均批内差 | 2.2 % |

### 2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度标准品加样量25  $\mu\text{L}$ , 按照操作步骤进行实验, 荧光值如下表所示:

| 标准品浓度<br>( $\mu\text{mol/mL}$ ) | 0     | 0.05  | 0.1   | 0.2   | 0.4   | 0.6   | 0.8   |
|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| OD 值                            | 0.104 | 0.161 | 0.225 | 0.348 | 0.563 | 0.802 | 0.956 |
|                                 | 0.107 | 0.163 | 0.222 | 0.344 | 0.547 | 0.786 | 0.950 |
| 平均 OD 值                         | 0.106 | 0.162 | 0.224 | 0.346 | 0.555 | 0.794 | 0.953 |
| 绝对 OD 值                         | 0.000 | 0.057 | 0.118 | 0.241 | 0.450 | 0.689 | 0.848 |

②绘制标曲(如下图):



## 附录2 实例分析

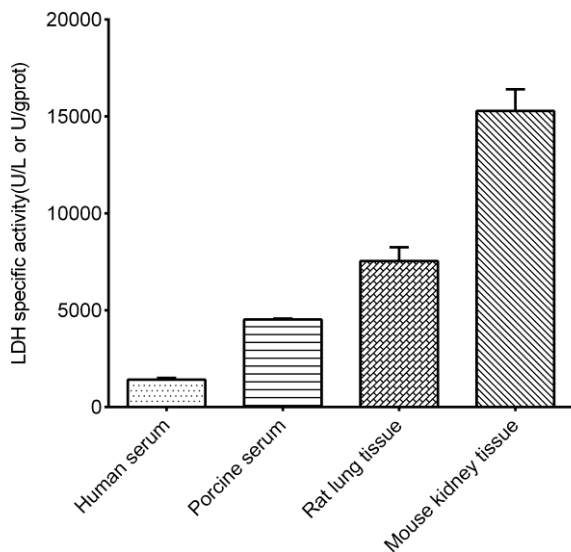
例如检测人血清(数据仅供参考):

用PBS(0.01 M, pH 7.4)将人血清稀释10倍, 取0.2 mL稀释后的人血清, 按操作表操作, 结果如下:

标准曲线:  $y = 1.082x + 0.0112$ , 测定管平均OD值为0.308, 对照管平均OD值为0.143, 计算结果为:

$$\text{LDH 活力 (U/L)} = (0.308 - 0.143 - 0.0112) \div 1.082 \times 10 \times 1000 = 1421.4 \text{ U/L}$$

按照说明书操作, 测定人血清(稀释10倍, 加样量200  $\mu\text{L}$ )、猪血清(稀释15倍, 加样量200  $\mu\text{L}$ )、大鼠肺组织(10%组织匀浆蛋白含量3.97 gprot/L, 稀释500倍, 加样量200  $\mu\text{L}$ )、小鼠肾组织(10%组织匀浆蛋白含量3.32 gprot /L, 稀释800倍, 加样量200  $\mu\text{L}$ )中乳酸脱氢酶的活力(如下图):





### 附录3 问题答疑

| 问题         | 可能原因     | 建议解决方案        |
|------------|----------|---------------|
| 样本和标准品显色很低 | 孵育时间太短   | 保证充足的孵育时间     |
|            | 显色时间过长   | 显色完全后立即测定     |
| 样本测不出值     | 样本稀释倍数太大 | 选择合适稀释倍数,重新检测 |
|            | 样本保存时间过长 | 取新鲜样本,重新检测    |
| 读数数值低      | 用不恰当波长检测 | 选择正确的检测波长     |

#### 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. Mu X, Xiang Z, Xu Y, et al. Glucose metabolism controls human  $\gamma\delta$  T-cell-mediated tumor immunosurveillance in diabetes[J]. Cellular & Molecular Immunology. IF:22.096
2. Tseng S.Ja. An acid degradable, lactate oxidizing nanoparticle formulation for non-small cell lung cancer virotherapy[J]. Nano Today. IF:18.962
3. Zhang H, Zheng Q, Guo T, et al. Metabolic reprogramming in astrocytes results in neuronal dysfunction in intellectual disability. Mol Psychiatry. 2022. IF:15.992
4. Salman T M, Iyanda M A, Alli-Oluwafuyi A M, et al. Telfairia occidentalis stimulates hepatic glycolysis and pyruvate production via insulin-dependent and insulin-independent mechanisms[J]. Metabolism Open, 2021, 10(1-10):100092. IF:8.694
5. Li Q, Peng J, Luo Y, et al. Far infrared light irradiation enhances A $\beta$  clearance via increased exocytotic microglial ATP and ameliorates cognitive deficit in Alzheimer's disease-like mice. J Neuroinflammation. 2022; 19 (1):145. IF:7.573
6. 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
7. Daily Dose of Bovine Lactoferrin Prevents Ethanol-Induced Liver Injury and Death in Male Mice by Regulating Hepatic Alcohol Metabolism and Modulating Gut Microbiota[J]. Molecular Nutrition & Food Research. IF:5.426
8. 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
9. Yu C, Wang D, Tong Y, et al. Trans -Anethole Alleviates Subclinical Necro-Haemorrhagic Enteritis-Induced Intestinal Barrier Dysfunction and Intestinal Inflammation in Broilers. Front Microbiol. 2022; 13:831882. IF:5.259
10. 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
11. 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

12. Zhong J, Sun P, Xu N, et al. Canagliflozin inhibits p-gp function and early autophagy and improves the sensitivity to the antitumor effect of doxorubicin[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2020, 175: 113856. IF:4.96
13. 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
14. Laurian R, Ravent J, Dementhon K, et al. *Candida albicans* Hexokinase 2 Challenges the *Saccharomyces cerevisiae* Moonlight Protein Model[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(4):848. IF:4.128
15. Liu J, Duan P, Xu C Y, et al. CircRNA circ-ITCH improves renal inflammation and fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice by regulating the miR-33a-5p/SIRT6 axis[J]. *Inflammation Research*, 2021. IF:4.114
16. 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
17. 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
18. 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
19. Ali A, Elsherbiny D, Azab S, et al. The diuretic amiloride attenuates doxorubicin-induced chemobrain in rats: Behavioral and mechanistic study[J]. *Neurotoxicology*, 2021, 88:1-13. IF:3.088
20. Yang H, Gan S, Jiang Z, et al. Protective effects of essential oil from *Fructus Alpiniae zerumbet* on retinal Müller gliosis via the PPAR- $\gamma$ -p-CREB signaling pathway[J]. *Chinese Medicine*, 2020, 15(1): 4. IF:2.96
21. Chen Wenqi, Li Yuehua, Zhong Jing et al. circ-PRKCI targets miR-1294 and miR-186-5p by downregulating FOXK1 expression to suppress glycolysis in hepatocellular carcinoma.[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23: undefined. IF:2.952
22. 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 $\uparrow$ PERK Pathway[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2019. IF:2.928

23. Li H, Xia T, Guan Y, et al. Sevoflurane Regulates Glioma Progression by Circ\_0002755/miR-628-5p/MAGT1 Axis[J]. *Cancer Management and Research*, 2020, 12: 5085. IF:2.886
24. Cheng F, Yu J, Zhang X, et al. CircSEC31A Promotes the Malignant Progression of Non-Small Cell Lung Cancer Through Regulating SEC31A Expression via Sponging miR-376a[J]. *Cancer Management and Research*, 2020, Volume 12:11527-11539. IF:2.886
25. Sanjeev S, Murthy M K, Devi M S, et al. Isolation, characterization, and therapeutic activity of bergenin from marlberry (*Ardisia colorata* Roxb.) leaf on diabetic testicular complications in Wistar albino rats[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019: 1-20. IF:2.8
26. Dede A, Arslanyolu M. The in vivo *Tetrahymena thermophila* extracellular glucose drop assay for characterization of mammalian insulin activity[J]. *European Journal of Protistology*, 2021, 79(1):125803. IF:2.432
27. Wang F, Chen H, Chen Y, et al. Diet-induced obesity is associated with altered expression of sperm motility-related genes and testicular post-translational modifications in a mouse model[J]. *Theriogenology*, 2020. IF:2.094
28. Bhargava P, Verma V K, Malik S, et al. Hesperidin Regresses Cardiac Hypertrophy by Virtue of PPAR- $\gamma$  Agonistic, Anti-Inflammatory, Antiapoptotic, and Antioxidant Properties[J]. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 2019: e22283. IF:1.837
29. Adeyemi W J, Abdussalam T A, Abdulrahim A, et al. Elevated, sustained, and yet reversible biotoxicity effects of lead on cessation of exposure: Melatonin is a potent therapeutic option[J]. *Toxicology and Industrial Health*, 2020, 36(7): 477-486. IF:1.708
30. Ustunova S, Takir S, Yilmazer N, et al. Hydrogen sulphide and nitric oxide cooperate in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in isolated rat heart[J]. *in vivo*, 2020, 34(5): 2507-2516. IF:1.541