

(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-M

产品规格: 96T(40 samples)

检测仪器: 酶标仪 (440-460 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

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血清、血浆、胸水、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 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	基质液 (Substrate Buffer)	5 mL×1 瓶	2-8°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	辅酶 I (Coenzyme I)	粉剂×1 支	2-8°C 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	显色剂 (Chromogenic Agent)	5 mL×1 瓶	2-8°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	碱溶液 (Alkali Reagent)	5 mL×1 瓶	2-8°C 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	2 μmol/mL 丙酮酸标准品 (2 μmol/mL Pyruvic Acid Standard)	1 mL×1 支	2-8°C 保存 6 个月
	酶标板	96 孔	无要求
	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（440-460 nm）、37°C恒温箱、微量移液器（1000 μL ，200 μL ，100 μL ，10 μL ）、多道移液器（300 μL ）。

耗材：枪头（1000 μL ，200 μL ，10 μL ）。

试剂：双蒸水、生理盐水（0.9% NaCl）或 PBS（0.01 M，pH 7.4）。

试剂准备

① 试剂盒中试剂平衡至室温（试剂二除外）。

② 试剂二应用液的配制：

取试剂二置于冰盒上，一支粉剂加1.33 mL双蒸水溶解，混匀，2-8°C可保存15天。如需多次检测，可分装后-20°C保存1个月。

③ 试剂四应用液的配制：

按试剂四：双蒸水为1:9的体积比混匀即可，现用现配，2-8°C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	⑧
标准品浓度($\mu\text{mol/mL}$)	0	0.05	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
2 $\mu\text{mol/mL}$ 标准品 (μL)	0	10	20	40	80	120	160	200
双蒸水(μL)	400	390	380	360	320	280	240	200

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°C，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 10⁶ 个细胞加入 300 μL 生理盐水 (0.9% NaCl) 或 PBS (0.01 M, pH 7.4) 进行机械匀浆或超声破碎。匀浆后，4°C，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：6-500 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

LDH 活力 (U/L)	样本与稀释液的体积比	稀释倍数
<500	不稀释	1
500-5000	1:9	10

注：稀释液为双蒸水或生理盐水 (0.9% NaCl) 或 PBS (0.01 M, pH 7.4)。

实验关键点

- ① 加试剂二应用液时，将枪头伸入反应液中反复吸打几次，并注意更换枪头。
- ② 加入试剂四后，用多道移液器进行混匀。
- ③ 加样时要尽量避免产生气泡。若有气泡，用枪头破碎后再进行测定。

操作步骤

- ① 标准孔：取 5 μL 双蒸水加入到标准孔中，再取 8 个不同浓度的标准品各 20 μL ，分别加入对应的标准孔中；
测定孔：加入 20 μL 待测样本；
对照孔：加入 5 μL 双蒸水、20 μL 待测样本。
- ② 向步骤①中的各孔加入 25 μL 试剂一。
- ③ 向步骤②中的测定孔加入 5 μL 试剂二应用液。
- ④ 混匀，37°C 孵育 15 min。
- ⑤ 向步骤④中的各孔加入 25 μL 试剂三，混匀，37°C 孵育 15 min。
- ⑥ 向步骤⑤中的各孔加入 200 μL 试剂四应用液，混匀，室温静置 5 min。
- ⑦ 波长 450 nm，测定 OD 值。

操作表

	标准孔	测定孔	对照孔
双蒸水 (μL)	5		5
不同浓度标准品 (μL)	20		
待测样本 (μL)		20	20
试剂一 (μL)	25	25	25
试剂二应用液 (μL)		5	
混匀，37°C 孵育 15 min			
试剂三 (μL)	25	25	25
混匀，37°C 孵育 15 min			
试剂四应用液 (μL)	200	200	200
混匀，室温静置 5 min，波长 450 nm，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：每升样本 37°C 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)。

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

(U/L)

动物组织、细胞样本：

定义：每克组织蛋白 37°C 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)。

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

(U/gprot)

注解：

y：标准品在 450 nm 波长处的绝对 OD 值

x：标准品的浓度

a：标曲的斜率

b：标曲的截距

ΔA_{450} ：测定孔 OD 值-对照孔 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*：1 L=1000 mL

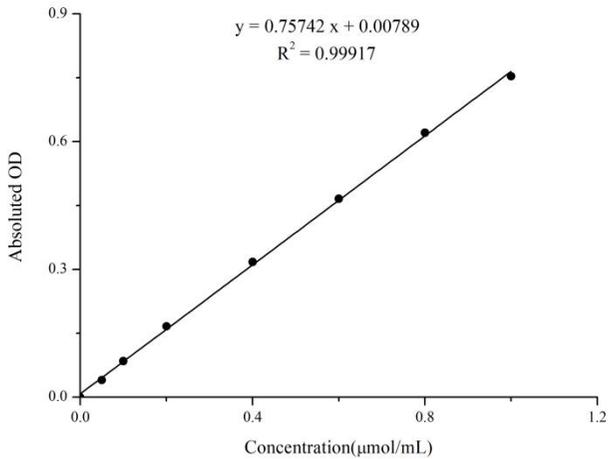
附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	6-500 U/L	平均批间差	2.4 %
灵敏度	6 U/L	平均批内差	1.8 %
平均回收率	98 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 标准曲线(如下图):



附录2 实例分析

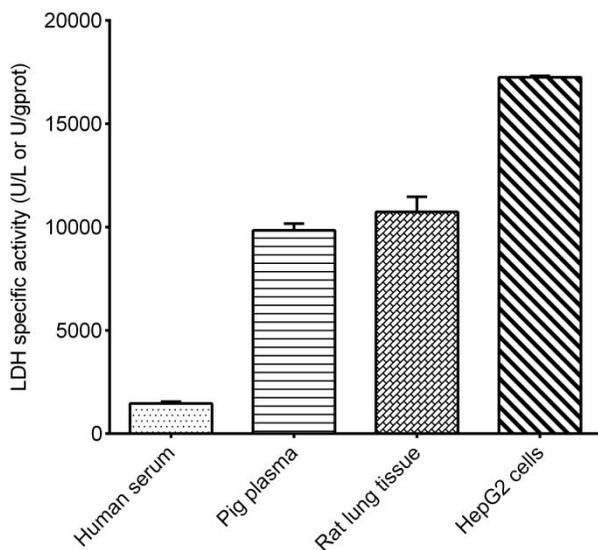
例如检测人血清(数据仅供参考):

用PBS (0.01 M, pH 7.4) 将人血清稀释10倍, 取0.02 mL稀释后的人血清, 按操作表操作, 结果如下:

标准曲线: $y = 0.75742x + 0.00789$, 测定孔平均OD值为0.232, 对照孔平均OD值为0.115, 计算结果为:

$$\text{LDH 活力 (U/L)} = (0.232 - 0.115 - 0.00789) \div 0.75742 \times 10 \times 1000 = 1440.548 \text{ U/L}$$

按照说明书操作, 测定人血清(稀释10倍, 加样量20 μL)、猪血浆(稀释50倍, 加样量20 μL)、大鼠肺组织(10%组织匀浆的蛋白含量6.51 g/L, 稀释500倍, 加样量20 μL)、HepG2细胞(蛋白含量3.41 g/L, 稀释200倍, 加样量20 μL)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
复孔差异大	未严格按照说明书操作	操作前认真阅读操作步骤和注意事项
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
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
	样本加样量较低	增加加样量
	样本保存时间过长或者保存不当	取用新鲜样本,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 β 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- γ -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?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- γ 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