

D-乳酸脱氢酶（D-LDH）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AMHF6-M48	乳酸脱氢酶（D-LDH）含量检测试剂盒	48T	微量法
AMHF6-M96		96T	微量法

一、测定意义：

乳酸脱氢酶是一种糖酵解酶，主要作用是催化乳酸氧化为丙酮酸，该指标升高可能是疾病的反应。乳酸脱氢酶是诊断心肌梗死，肝脏疾病，血液系统疾病，恶性肿瘤的重要指标。

二、测定原理：

乳酸脱氢酶（D-LDH）催化 NAD^+ 氧化 D-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。

三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量（48T）	试剂装量（96T）	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	液体 110 mL×1 瓶	2~8℃保存
试剂一	液体 6 mL×1 瓶	液体 12 mL×1 瓶	2~8℃保存
试剂二	粉剂 ×1 支	粉剂 ×1 支	-20℃避光保存
	临用前加入 1.3 mL 蒸馏水充分溶解备用，配好后可分装成小管-20℃保存，可保存 2 周，禁止反复冻融		
试剂三	液体 6 mL×1 瓶	液体 12 mL×1 瓶	2~8℃避光保存
试剂四	液体 18 mL×1 瓶	液体 35 mL×1 瓶	2~8℃保存
标准品	液体 1mL×1 瓶	液体 1mL×1 瓶	2~8℃保存

四、操作步骤：

样本前处理

1、组织：取一定量植物组织擦净水分及杂质，剪碎后放入研钵，加入液氮，研磨成粉状后转移出来，然后准确称重，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），旋涡混匀抽提 3-5 分钟或者使用组织破碎仪冰浴提取，8000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、细菌/细胞：按照细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 200W，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 5min）；然后 10000g，4℃离心 10min，取上清置于冰上待测。

3、血清（浆）等液体样本：直接测定。若有浑浊请离心后取上清待测。

测定步骤

- 1、酶标仪预热30min 以上，调节波长至450nm，蒸馏水调零。
- 2、临用前将10mg/mL标准品用蒸馏水稀释成0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.015625、0.0078125、0mg/mL的标准液备用。

3、操作表（96孔板中操作）

试剂名称	测定管	对照管	标准管	空白管
待测样本(μL)	10	10	-	-
标准品(μL)	-	-	10	-
试剂一(μL)	50	50	50	50
试剂二(μL)	10	-	-	-
蒸馏水(μL)	-	10	10	20
充分混匀，37°C水浴 15min				
试剂三(μL)	50	50	50	50
充分混匀，37°C水浴 15min				
试剂四(μL)	150	150	150	150
充分混匀，室温静置 3min，450nm 下测定吸光度，记为 A 测定管，A 对照管，A 标准管，A 空白管。计算 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管， ΔA 标准=A 标准管-A 空白管。每个测定管需要设一个对照管。				

五、D-乳酸脱氢酶（D-LDH）活力计算：

1、标准曲线的绘制

根据标准管的浓度（x，mg/mL）和吸光度 ΔA 标准（y， ΔA 标准）建立标准曲线。根据标准曲线，将 ΔA （y， ΔA ）带入公式计算样本浓度（x，mg/mL）。

2. 血清（浆）D-LDH 活力的计算

单位的定义：每 mL 血清（浆）每分钟催化产生 1mg 丙酮酸定义为一个酶活性单位。

$$\text{D-LDH 活性 (U/mL)} = x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T$$

3. 细胞、细菌和组织中 L-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 1mg 丙酮酸定义为一个酶活性单位。

$$\text{D-LDH 活性 (U/mg prot)} = x \times V_{\text{样}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T$$

（2）按样本质量计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟催化产生 1mg 丙酮酸定义为一个酶活性单位。

$$\text{D-LDH 活性 (U/g 质量)} = x \times V_{\text{样}} \div (W \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T$$

(3) 按细菌或细胞计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1mg 丙酮酸定义为一个酶活性单位。

$$D\text{-LDH 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = x \times V_{\text{样}} \div (N \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T$$

V 样：反应体系中加入的样本体积，10 μ L=0.01mL；

V 样总：加入的提取液体积，1mL；

T：反应时间，15min；

Cpr：蛋白质浓度，mg/mL；

W：样本质量，g；

N：细胞或细菌总数，以万计；

六、注意事项：

1、. ΔA 大于 1.3 或者小于 0.01 时，建议将样本用蒸馏水稀释或者增大样本量进行实验，注意同步修改计算公式。

2、为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定。