

乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒(二硝基苯肼微板法)

产品简介:

乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH 或 LD)属于氧化还原酶,能够催化氢氧原子或电子从一种底物转移到另一种底物上。乳酸脱氢酶是糖酵解和糖异生的一个极其重要的酶,含有锌离子,广泛分布于人和动物组织、植物和微生物中,能可逆的催化乳酸(L)和丙酮酸(P)之间的氧化还原反应;其反应公式: $\text{乳酸} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{丙酮酸} + \text{NADH} + \text{H}^+$, 其中: $\text{L} \rightarrow \text{P}$ 为正向反应; $\text{P} \rightarrow \text{L}$ 为逆向反应。

乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒(二硝基苯肼微板法)其检测原理是以 NAD 为受氢体,乳酸脱氢酶催化乳酸脱氢生成丙酮酸,丙酮酸与二硝基苯肼反应生成丙酮酸二硝基苯腙,后者在碱性溶液中呈棕红色,颜色深浅与丙酮酸浓度呈正比,酶标仪检测 440nm 处吸光度,通过测得的丙酮酸含量计算酶的活性。该方法的优点是: 1、试剂原料易获得; 2、较为经典的方法; 3、适用于手工操作。该试剂盒仅用于科研领域,不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

名称 \ 编号	BN27229 50T	Storage
试剂(A): 丙酮酸标准	22mg	RT
试剂(B): LDH Assay Buffer	3ml	4°C 避光
试剂(C): NAD	1 支	-20°C
试剂(D): 二硝基苯肼溶液	1.5ml	4°C 避光
试剂(E): 碱性显色液	5ml	RT
试剂(F): LDH 保护剂	1 支	4°C 避光
试剂(G): LDH 保护稀释液	1.5ml	RT
使用说明书	1 份	

自备材料:

- 1、蒸馏水、提取液(PBS 或 PBS-Triton 溶液(0.5%))
- 2、离心管、离心机、恒温箱或水浴锅、超声波破碎仪、酶标仪、96 孔板

操作步骤(仅供参考):

1、准备样品:

- (1) 组织样本: (a) 称取约 0.1g 组织加入研钵中,加入 1ml 提取液,进行冰浴匀浆; (b) 12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清液, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量,可按照组织质量(g): 提取液体积(ml)为 1:5~10 的比例提取。

- (2) 细菌/细胞样本: (a) 收集细菌或细胞到离心管内,离心弃上清; (b) 取 5×10^6 个细

菌或细胞加入 1ml 提取液，冰浴超声波破碎细菌或细胞(强度 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次)；(c) 12000rpm，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照每 $0.5 \sim 1 \times 10^7$ 个细菌/细胞加入 1ml 提取液进行提取。红细胞内 LDH 活性比血清酶活性高约 100 倍，故不能使用溶血样本。

(3) 液体样本：澄清的液体直接检测；若浑浊则离心后取上清检测。

【注】：血清或肝素抗凝血浆检测效果较好，草酸盐、EDTA 抗凝剂对 LDH 活性有抑制作用。LD₄和 LD₅对冷不稳定，提取出来的血清样本，不宜冰箱放置，室温放置 2~3 天有效。脑脊液内 LDH 活性较低，应直接加入体系中进行测定，不建议稀释。

(4) 长期保存样品：如果提取后的样品无法及时检测，需要放置时间较长，按下列方法操作：取 LDH 保护剂 1 支，加入 1ml 的 LDH 保护稀释液，配制成 LDH 保护工作液，-20℃避光保存；按待测样品(如血清)：LDH 保护工作液=9:1 的比例混合，4℃避光保存。

2、配制 NAD 溶液：取 1 支 NAD(粉末)，溶解于 1.5ml 蒸馏水，即成。

3、配制碱性显色工作液：按碱性显色液：蒸馏水=2:3 的比例混合，即为碱性显色工作液。

4、稀释标准品：取丙酮酸标准 1 支(22mg)，准确加入蒸馏水 2ml，充分混匀，即配制成丙酮酸标准(50mmol/L)，4℃保存备用。临用前，按丙酮酸标准(50mmol/L)：LDH Assay Buffer=1：99 的比例混合，即为丙酮酸标准(0.5mmol/L)，再按下表稀释系列标准品。

【注：0.5mmol/L=0.5μmol/mL】

加入物(单位：ml)	1	2	3	4	5	6
丙酮酸标准(0.5μmol/ml)	0.0125	0.025	0.05	0.075	0.1	0.125
LDH Assay Buffer	0.2375	0.225	0.2	0.175	0.15	0.125
丙酮酸浓度(μmol/ml)	0.025	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25

5、LDH 酶促：按照下表设置空白管、标准孔、对照孔、测定孔，溶液应按照顺序依次加入，并注意避免产生气泡；如果样品中酶活性过高，可减少样品用量或适当稀释后再行测定。

加入物(单位：μl)	空白孔	标准孔	对照孔	测定孔
蒸馏水	7.5	7.5	5	—
系列丙酮酸标准(1~6 号)	—	25	—	—
待测样品(如血清等)	—	—	2.5	2.5
LDH Assay buffer	25	—	25	25
混匀，37℃孵育 5min。				
NAD 溶液	—	—	—	5
混匀，37℃孵育 15min，空白和标准无须 37℃孵育。				
二硝基苯肼溶液	25	25	25	25
混匀，37℃孵育 15min。				
碱性显色工作液	250	250	250	250

本产品仅用于科研

TEL: 010-82422342 www.biorigin.Ltd

【注】：酶促反应中组织匀浆液取样量为 5~30ul，应相应增加其余各孔中蒸馏水的用量。如果样品中酶活性过高，可减少样品用量或适当稀释后再行测定。碱性显色液有一定腐蚀性，请小心操作。

6、LDH 测定：混匀，室温放置 5min，酶标仪 440nm 处测定各孔吸光度(记为 $A_{\text{空白}}$ 、 $A_{\text{标准}}$ 、 $A_{\text{对照}}$ 、 $A_{\text{测定}}$)。检测应在 3~15min 内完成，否则吸光度会下降。

计算：LDH 活性单位的定义：以 100ml 血清，在 37°C 孵育 15min，LDH 催化底物产生 1μmol 丙酮酸为一个金氏酶活力单位。根据酶活性定义，计算出样品中的 LDH 活性。

以丙酮酸浓度(μmol/mL)为横坐标，以($A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$)吸光度之差值为纵坐标，绘制标准曲线，用($A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$)吸光度之差值在标准曲线上查出待测样品产生的丙酮酸浓度(μmol/mL)，按下述公式进行计算：

100mL 血清样本中乳酸脱氢酶的活性计算： $LDH (U/100 \text{ mL}) = 100/(V/N) \times (c \times V) = 100cN$

其他样本乳酸脱氢酶的活性计算： $LDH (U/mL) = 1/(V/N) \times (c \times V) = cN$

其中： $A_{\text{标准}}$ = 标准管的吸光度

$A_{\text{空白}}$ = 空白管的吸光度

$A_{\text{测定}}$ = 测定管的吸光度

$A_{\text{对照}}$ = 对照管的吸光度

V = 反应体系中待测样品的加入量 = 2.5μl = 0.0025(mL)

c = 样品产生的丙酮酸浓度(μmol/mL)

N = 样品稀释倍数

注意：如果待测样品加入 LDH 保护工作液，其结果应除以 0.9。

人血清 LDH：190~310 U/100 mL

注意事项：

- 1、处理后的样品应及时检测，否则易失效。
- 2、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 3、试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

有效期：6 个月有效。低温运输，按要求保存。