

## 乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒(二硝基苯胍微板法)

### 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,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: 乳酸+NAD<sup>+</sup>→丙酮酸+NADH+H<sup>+</sup>, 其中: L→P为正向反应; P→L为逆向反应。

乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒(二硝基苯胍微板法)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,丙酮酸与二硝基苯胍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、试剂原料容易获得; 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	ADS027TE1	Storage
		100T	
试剂(A): 丙酮酸标准(5mmol/L)		1ml	4°C 避光
试剂(B): LDH Assay Buffer		6ml	4°C 避光
试剂(C): NAD Buffer		0.5ml	-20°C
试剂(D): 二硝基苯胍溶液		3ml	4°C 避光
试剂(E): 碱性显色液		10ml	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、离心管、离心机
- 2、恒温箱或水浴锅、酶标仪、96孔板

### 操作步骤(仅供参考)

- 1、准备样品:

①血浆、血清样品：血浆、血清按照常规方法制备，10倍稀释后可以用于该试剂盒的测定，室温保存3天，用于LDH的检测。

②细胞或组织样品：取恰当细胞或组织进行匀浆，低速离心取上清，室温保存3天，用于LDH的检测。

③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。

④(选做)样品准备完毕后可以用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度，以便于后续计算单位蛋白重量组织或细胞内的LDH含量。

2、稀释标准品：用LDH Assay Buffer准确稀释丙酮酸标准(5mmol/L)至0.5mmol/L，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

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、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(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 Buffer	—	—	—	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

5、LDH测定：混匀，室温放置5min，酶标仪440nm处测定各孔吸光度(记为 $A_{\text{空白}}$ 、 $A_{\text{标准}}$ 、 $A_{\text{对照}}$ 、 $A_{\text{测定}}$ )。

**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1 $\mu\text{mol}$ 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( $\mu\text{mol/L}$ )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( $\mu\text{mol/L}$ )，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： $\text{LDH (U/100 mL)} = 100/(V/N) \times (c \times V) = 100cN$

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

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=2.5 $\mu\text{l}$ =0.0025(mL)

$c$ =样品产生的丙酮酸浓度( $\mu\text{mol/mL}$ )

$N$ =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、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。
- 2、脑脊液内 LDH 活性较低，应直接加入 2.5 $\mu\text{l}$  进行测定，而不建议稀释。其他样本都需稀释后测定。
- 3、红细胞内 LDH 活性较血清酶活性高约 100 倍，故不能使用溶血样本。处理后的样品应及时检测，否则易失效。
- 4.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。
- 5、比色应在3~15min内完成，否则吸光度会下降。
- 6、酶促反应中，组织匀浆液取样量为5~30 $\mu\text{l}$ ，应相应增加空白和标准中蒸馏水的用量。
- 7、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。
- 8、碱性显色液有一定腐蚀性，请小心操作。
- 9、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

**有效期：**6个月。

**附录：参考标准曲线范围：**采用分光光度计测定LDH活力单位在125~1000范围时，( $A_{标准}$ - $A_{空白}$ )吸光度之差值在0.03~0.3之间，由于检测仪器和操作手法等条件的不同，参考值范围会有波动。

乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒(二硝基苯肼比色法)

