

## 乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒(LD-P 比色法)

### 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中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: 乳酸+NAD<sup>+</sup>→丙酮酸+NADH+H<sup>+</sup>。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(LD-P比色法)是利用乳酸脱氢酶催化上述逆反应,即丙酮酸+NADH+H<sup>+</sup>→乳酸+NAD<sup>+</sup>,在上述反应过程中丙酮酸还原成乳酸,同时NADH氧化成NAD<sup>+</sup>,引起340nm处吸光度的下降,其下降速率与标品中LDH活性呈正比关系,通过分光光度计或自动分析仪检测340nm处吸光度下降速率,通过计算获得乳酸脱氢酶的活性;该LD-P法的优点是:1、操作比二硝基苯肼比色法简单;2、重复性好;3、准确性比二硝基苯肼法好;4、适用于自动分析仪。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	ADS026TE0 100T	Storage
试剂(A): NADH	2支	-20°C 避光
试剂(B): LD-P Assay Buffer	250ml	RT
试剂(C): 丙酮酸溶液	2 × 1.5ml	4°C
试剂(D): 丙酮酸稀释液	30ml	RT
试剂(E): LDH 保护剂	1支	4°C 避光
试剂(F): LDH 保护稀释液	1.5ml	RT
使用说明书	1份	

### 自备材料

- 1、离心管或小试管
- 2、水浴锅
- 3、比色杯
- 4、分光光度计或自动分析仪

## 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, 可以直接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,  $-20^{\circ}\text{C}$ 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,  $4^{\circ}\text{C}$ 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、配制LDH检测储存液( $10\times$ ): 取1支NADH, 按NADH: LD-P Assay Buffer=1支: 10ml的比例混合, 即为LDH检测储存液( $10\times$ );  $-20^{\circ}\text{C}$ 保存, 2月有效。

3、配制LDH检测工作液: 取适量的LDH检测储存液( $10\times$ ), 按LDH检测储存液( $10\times$ ): LD-P Assay Buffer=1: 9的比例混合, 即为LDH检测工作液;  $-20^{\circ}\text{C}$ 保存, 2周有效。

4、配制丙酮酸工作液: 取适量的丙酮酸溶液, 按丙酮酸溶液: 丙酮酸稀释液=1: 9的比例混合, 即为丙酮酸工作液;  $4^{\circ}\text{C}$ 保存, 1个月有效。

5、分光光度计测定: 按照下表设置测定管, 溶液应按照顺序依次加入, 并注意避免产生气泡。如果样品中的LDH浓度过高, 可以减少样品用量或适当稀释后再进行测定, 样品的检测最好能设置平行管。

加入物(ml)	测定管
待测样品(血清、血浆、体液等)	0.05
LDH 检测工作液	2.0
混匀, $37^{\circ}\text{C}$ 孵育 5min。	
丙酮酸工作液( $37^{\circ}\text{C}$ 提前预热)	0.2

混匀, 比色杯光径1cm, 立即以分光光度计340nm处读取各管吸光度, 记录为 $A_{\text{测定}1}$ 。每1min读取各管吸光度, 记录为 $A_{\text{测定}2}$ 。注意: 由于酶促反应时间极短, 建议加入丙酮酸工作液后立即检测, 加样时间越短越好, 其反应基本在1~2min内, 其后反应趋于平缓。标准品检测参考值在0.1~0.2之间, 由于检测仪器、操作手法以及样品酶活性高低等条件的不同, 参考值范围会有波动。

6、自动分析仪测定：如果样品中浓度过高，可减少样品用量或适当稀释后再进行测定。样品的检测最好能设置平行管。根据实验室的自动分析仪性能，设置参数，下列参数仅供参考：

温度	37°C
pH	7.4
波长	340nm
延迟时间	0
检测时间	180s
待测样品	10μl
LDH 检测工作液	260μl
丙酮酸工作液	26μl

记录待测样品管吸光度的下降速率( $\Delta A/\text{min}$ )。

### 计算

手工比色计算公式： $\text{LDH(U/L)} = \Delta A/\text{min} \times (10^6/6220) \times (2.25/0.05) = \Delta A/\text{min} \times 7235$

式中： $\Delta A/\text{min} = (A_{\text{测定1}} - A_{\text{测定2}})/t$

6220 = NADH 的吸光度

2.25 = 反应液的总体积(ml)

0.05 = 待测样品体积(ml)

自动分析仪计算公式： $\text{LDH(U/L)} = \Delta A/\text{min} \times (10^6/6220) \times (296/10) = \Delta A/\text{min} \times 4758.8$

式中： $\Delta A/\text{min}$  = 测定的 340nm 吸光度的下降速率

6220 = NADH 的吸光度

296 = 反应液的总体积( $\mu\text{l}$ )

10 = 待测样品体积( $\mu\text{l}$ )

注意：如果待测样品加入 LDH 保护工作液，其结果应除以 0.9。

### 参考范围

成年健康人	200 ~ 380U/L
-------	--------------

### 注意事项

- 1、本法线性范围可达3000U/L，当LDH浓度高于该范围可使用LD-P Assay Buffer适当稀释后再进行检测，测出结果乘以稀释倍数。
- 2、处理后的样品应及时检测，否则LD<sub>4</sub>和LD<sub>5</sub>易失效。
- 3、血清或肝素抗凝血浆检测效果较好，草酸类、EDTA抗凝剂对LDH活性有抑制作用。
- 4、避免使用溶血样品。

**有效期：**6个月。低温运输，按要求保存。