

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。

Leagene 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胍,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 | TE0158 | 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 0.5 mmol/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(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 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℃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($\mu\text{mol/mL}$)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($\mu\text{mol/mL}$), 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: $\text{LDH (U/100 mL)} = 100/(V/N) \times (c \times V) = 100cN$

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

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 μl , 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。
- 10、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。

相关产品:

| 产品编号 | 产品名称 |
|--------|-----------------------------|
| CA0005 | 氨苄青霉素溶液(Ampicillin,50mg/ml) |
| DH0006 | 苏木素伊红(HE)染色液(醇溶) |
| DP0013 | GUS 染色液(即用型) |
| NR0002 | Trizol(总 RNA 提取试剂) |
| TC0699 | 植物总糖和还原糖检测试剂盒(DNS 比色法) |
| TC0713 | 葡萄糖检测试剂盒(GOD-POD 比色法) |
| TC1167 | 尿素(Urea)检测试剂盒(脲酶波氏比色法) |