

## 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: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。

Biorigin 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	BN27229 100T	Storage
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

本产品仅用于科研

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。

本产品仅用于科研

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、LD<sub>4</sub> 和 LD<sub>5</sub> 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。
- 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。