

乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒(二硝基苯肼比色法)

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: $\text{乳酸} + \text{NAD}^+ \leftrightarrow \text{丙酮酸} + \text{NADH} + \text{H}^+$, 其中: L \rightarrow P 为正向反应; P \rightarrow L 为逆向反应。

Biorigin 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,分光光度计检测 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	BN27230 50T	Storage
试剂(A): 丙酮酸标准(5mmol/L)		1ml	4°C 避光
试剂(B): LDH Assay Buffer		25ml	4°C 避光
试剂(C): NAD Buffer		2ml	-20°C
试剂(D): 二硝基苯肼溶液		15ml	4°C 避光
试剂(E): 碱性显色液		50ml	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、离心管或试管、离心机
- 2、水浴锅或恒温箱、比色杯、分光光度计

操作步骤(仅供参考):

- 1、准备样品:

本产品仅用于科研

- ①血浆、血清样品：血浆、血清按照常规方法制备，5倍稀释后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℃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、标准管、对照管、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: ml)	空白管	标准管	对照管	测定管
蒸馏水	0.075	0.075	0.05	—
系列丙酮酸标准(1~6号)	—	0.25	—	—
待测样品(如血清等)	—	—	0.025	0.025
LDH Assay Buffer	0.25	—	0.25	0.25
混匀，37℃孵育5min。				
NAD Buffer	—	—	—	0.05
混匀，37℃孵育15min，空白和标准无须孵育。				
二硝基苯肼溶液	0.25	0.25	0.25	0.25
混匀，37℃孵育15min。				
碱性显色工作液	2.5	2.5	2.5	2.5

- 5、LDH测定：混匀，室温放置5min，比色杯光径1cm，用蒸馏水调零，分光光度计440nm处测定各管吸光度(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 μ 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(μ mol/mL)为横坐标，以($A_{标准}-A_{空白}$)吸光度之差值为纵坐标，绘制标准曲线，用($A_{测定}-A_{对照}$)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(μ 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： $LDH (U/100 mL) = 100/(V/N) \times (c \times V) = 100cN$

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

其中： $A_{标准}$ = 标准管的吸光度

$A_{空白}$ = 空白管的吸光度

$A_{测定}$ = 测定管的吸光度

$A_{对照}$ = 对照管的吸光度

V = 反应体系中待测样品的加入量 = 0.025(mL)

c = 样品产生的丙酮酸浓度(μ 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 0.025mL 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 5~30ul，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。