

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⁺→丙酮酸+NADH+H⁺。L→P 为正向反应; P→L 为逆向反应。

Leagene 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⁺→乳酸+NAD⁺,在上述反应过程中丙酮酸还原成乳酸,同时NADH氧化成NAD⁺,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 | TE0157 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°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°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°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°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°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°C 孵育 5min。 | |
| 丙酮酸工作液(37°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, Leagene 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。Leagene 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(μl)

10=待测样品体积(μl)

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 LD₄ 和 LD₅ 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。
- 5、 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 6、 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) |