



乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒

(货号: A020-4-1 微板法 升级版 96T)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书, 预试后再进行批量实验, 否则由此导致的后果用户自行承担!

一、测定原理

乳酸 $\xrightarrow{\text{LDH}}$ 丙酮酸丙酮酸 + 2,4 - 二硝基苯肼 $\xrightarrow{37^\circ\text{C温浴} + \text{碱}}$ 丙酮酸二硝基苯腙 (红棕色)

根据比尔定律, 可测乳酸脱氢酶 (LDH) 活性。

二、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 6 个月)

	组分	规格	保存
试剂一	基质缓冲液	5mL×1 瓶	2~8℃
试剂二	促进剂	0.5mL×1 支	2~8℃
	试剂二应用液配制: 将试剂二与蒸馏水按 1:5 的体积比混合, 现用现配。		
试剂三	显色剂	5mL×1 瓶	2~8℃避光
试剂四	浓缩终止剂	5mL×1 瓶	2~8℃
	终止剂的配制: 将浓缩终止剂用蒸馏水 1:8(9 倍)稀释, 需多少配多少		
试剂五	2μmol/mL 丙酮酸钠标准液	1mL×1 支	2~8℃
	0.2μmol/mL 丙酮酸钠标准液配制: 取 2μmol/mL 丙酮酸钠标准液用蒸馏水 10 倍 (1:9) 稀释, 现用现配		
	附送 96 孔板一块(空白板, 可自备使用)		

三、样本采集及保存:

- 1、本试剂盒适用于检测动物血清(或肝素抗凝血浆)、组织、灌流液、细胞及细胞培养液等中乳酸脱氢酶(LDH)的活力。
- 2、如不能及时检测, 请将样本放置于-20℃以下保存。

四、所需仪器及试剂:

可调 440nm(或 430-450nm)波长的酶标仪及 96 孔板(附送一块), 蒸馏水, 生理盐水(或 0.01M 浓度的 PBS), 37℃ 水浴锅或恒温箱, 蛋白测定试剂(组织或细胞样本用, 本公司有售)。

五、测定步骤:

(一)、样本前处理:

血清(浆)等液体样本: 直接使用。**细胞培养液:** 吸取部分 1000 转/分离心 5 分钟, 取上清检测。**细胞样本:** 收集细胞后, 每份细胞(细胞数量尽量不要低于 10⁶ 个, 越多越好)加入 0.3mL 的生理盐水(或者 PBS), 冰水浴下超声破碎(功率 200-300W, 运行 5 秒, 间隔 15 秒, 反复 3-5 次), 4000 转/离心 10 分钟, 取上清液(上清液需要测定其蛋白浓度, 蛋白测定试剂盒本公司有售)待测。**动物组织样本:** 准确称取组织重量, 按重量(g): 体积(mL)=1:9 的比例, 加入 9 倍体积的生理盐水, 冰水浴条件下机械匀浆, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液(上清液需要测定其蛋白浓度, 蛋白测定试剂盒本公司有售)待测。**植物组织样本:** 方法一: 先将植物组织用 PBS 擦洗干净, 再用吸水纸吸干, 后剪碎放入研钵中, 液氮研磨成粉, 称取植物粉末, 按重量(g): 体积(mL)=1:9 的比例, 加入 9 倍体积的 PBS, 涡旋震荡(或研磨仪研磨) 1 分钟, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液待测; 方法二: 是在洗净并擦干水分后, 直接称重, 按重量(g): 体积(mL)=1:9 的比例, 加入 9 倍体积的 PBS, 冰水浴条件下机械匀浆, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液待测。(注: 一般水分含量较高的植物用方法二来处理, 相反水分含量低或者干样推荐用方法一处理)

(二)、操作表

	空白孔	标准孔	测定孔	对照孔
蒸馏水(μL)	40	24		24
0.2μmol/mL 丙酮酸钠标准液(μL)		16		
待测样本(μL)			16	16
试剂一(μL)	20	20	20	20
试剂二应用液(μL)			24	
轻轻振荡孔板混匀, 37℃温浴 15 分钟				
试剂三(μL)	20	20	20	20
轻轻振荡孔板混匀, 37℃温浴 15 分钟				
终止剂(μL)	180	180	180	180
轻轻振荡孔板混匀, 室温放置 5 分钟, 波长 440nm, 酶标仪测定吸光度值 A。				

*参考样本浓度: 小鼠脑组织匀浆一般稀释成 0.01% 浓度测, 人血清一般 10 倍稀释后测(以上浓度仅供参考, 以具体样本值为准)。若样本中 LDH 酶活力太高(A_{测定}-A_{对照} 大于 0.3), 可将样本用生理盐水稀释后再测。具体摸索方法见附录。

注: 1、注意对照孔中不加试剂二应用液。

2、严格按照说明书从上往下的顺序操作。

3、本体系可根据需要进行调整(体系总体积不要低于 0.2mL)。

六、计算及举例:

1、血清(浆)、培养液等液体样本乳酸脱氢酶定义及计算公式:
定义: 每升样本 37℃ 与基质作用 15 分钟, 在反应体系中产生 1μmol 丙酮酸为 1 单位 U。

计算公式:

$$\text{LDH 活性 (U/L)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N \times 1000$$

2、组织、细胞样本乳酸脱氢酶定义及计算公式:

定义: 样本中每克蛋白对应的酶量在 37℃ 与基质作用 15 分钟, 使反应体系中产生 1μmol 丙酮酸为 1 单位 U。

计算公式:

$$\text{组织、细胞中 LDH 活性 (U/g 蛋白)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N \div \text{Cpr}$$

以上公式中:

N: 样本测试前稀释倍数;

C_{标准}: 标准液浓度, 0.2μmol/mL;

1000: 液体样本体积单位换算, mL→L;

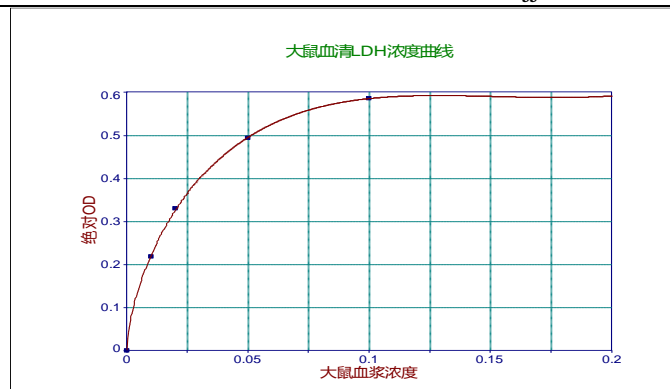
Cpr: 样本匀浆液蛋白浓度, g/mL。

七、注意点:

- 1、由于加样量比较少, 建议: ① 加样时左手稳住加样枪; ② 将吸头靠近酶标孔底部, 缓慢加样, 边加边将吸头上移, 以保证吸头上样本残留量最少; ③ 如有秤盘式离心机, 可缓慢离心数分钟, 以保证样本及试剂聚集至酶标孔底部, 以减少误差。
- 2、加试剂时需要注意, 速度不宜太快, 以免溅出酶标孔。
- 3、酶标孔比较小, 所以混匀力度要适中, 使用摇床或手动混匀时, 动作不宜太过剧烈, 以免液体溅出, 太慢则混匀不充分; 先将孔壁上的液体轻轻的震动落下, 再前后、左右的摇动。
- 4、酶标板可能存在初始吸光度的差异, 最好在使用前先在相应的波长处测定其初始吸光度, 记录下差异, 然后再加样测定。
- 5、试剂二促进剂加样量比较少, 所以加入时尽量靠近孔底部液面处, 这样加完后轻轻振荡孔板就能使其与底部液体接触。



- 6、加样时要避免产生气泡。倘若有气泡，须将气泡破碎后再进行读数。
- 7、本试剂盒仅用于科研、实验室。
- 8、96孔板可自备,如自备的孔板每孔容量低于260 μ L,可先在离心管中反应完再吸取200 μ L加入到孔板中读数。



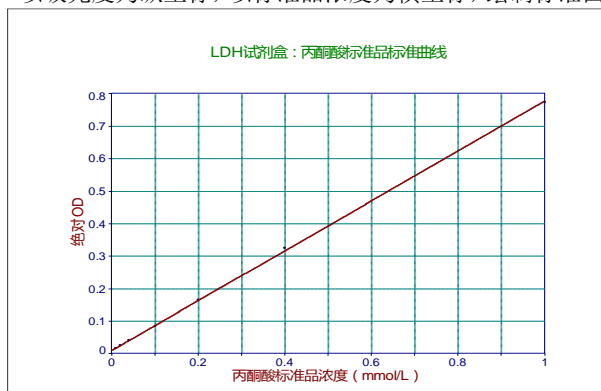
附录 I：标准曲线制备（可不作）

1、操作：

将2 μ mol/mL的丙酮酸钠标准液用蒸馏水分别稀释200倍、100倍、50倍、20倍、10倍、5倍、2倍后按照操作表标准孔操作制作标准曲线。

2、绘图如下：

以吸光度为纵坐标，以标准品浓度为横坐标，绘制标准曲线。



注：标准曲线仅供参考，用户无需制作。

附录III：大鼠肾匀浆LDH取样浓度摸索

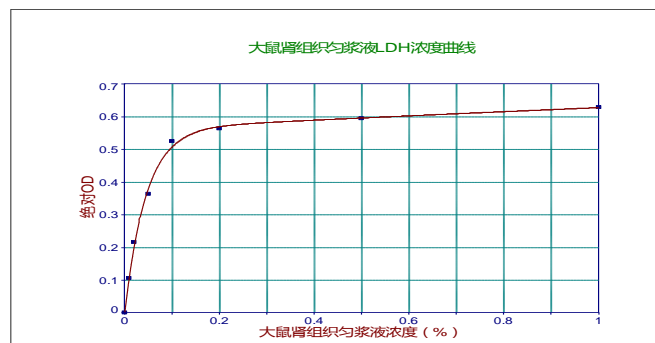
1、样本：正常组大鼠肾组织

2、前处理：

大鼠肾组织取出后用生理盐水制成10%的匀浆上清液（具体见实验方法学），用生理盐水10倍稀释成1%后再用生理盐水分别稀释成不同的浓度：0.01%、0.02%、0.05%、0.1%、0.2%、0.5%，稀释完按操作表进行操作。同时用0.5%的肾组织匀浆液用于蛋白定量（考马斯亮蓝法测定蛋白，本公司有售）。

3、结果：

样本浓度	空白	0.01%	0.02%	0.05%	0.1%	0.2%	0.5%	1%
测定 OD	0.0588	0.1653	0.2807	0.4473	0.6187	0.6979	0.8065	0.9133
对照 OD	0.0588	0.0594	0.0636	0.0833	0.0930	0.1340	0.2120	0.2835
绝对 OD	0.0000	0.1059	0.2171	0.3641	0.5257	0.5639	0.5945	0.6298



由以上曲线可见绝对吸光度OD值介于0.05~0.50之间呈线性相关，最佳绝对吸光度控制在0.2~0.3之间，根据您实验中的具体情况来选择最佳取样浓度。

附录 II：大鼠血浆LDH取样浓度摸索

1、样本：大鼠血浆。

2、将大鼠血浆稀释不同倍数后按操作表操作（将原大鼠血浆浓度视为1，则100倍稀释后浓度视为0.01，以此类推其他相应浓度）

3、测定结果：

稀释倍数	空白	100倍	50倍	20倍	10倍	5倍
测定 OD	0.0589	0.2799	0.3973	0.5795	0.6929	0.7427
对照 OD	0.0589	0.0613	0.0667	0.0851	0.1064	0.1509
绝对 OD 值	0.0000	0.2186	0.3306	0.4944	0.5866	0.5918

参考取样浓度：大鼠血浆为100倍稀释。在其范围内酶曲线通过回归曲线的处理，相对成正比关系。（若稀释浓度过大或过少，则在实验结束后，在进行统计学处理时会出现无显著差异）