

乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒说明书

(货号: A020-1 比色法)

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、试剂盒组成及试剂配制: (试剂盒有效期 6 个月)

	试剂组成	A020-1-1 50 管/24 样	A020-1-2 100 管/48 样	保存条件
试剂一	基质缓冲液	15mL×1 瓶	30mL×1 瓶	短时间可 2~8℃ 保存,长时间保存 需放-20℃
试剂二	辅酶	粉剂×2 支	粉剂×3 支	-20℃保存
辅酶应用液的配制: 每支粉剂加 1.3mL 蒸馏水溶解,溶解后冷冻保存 2 周,如需多次使用建议分装冷冻(避免反复冻融)。(注:粉剂量较少,可能附着于管壁或盖子上,并非空管,如使用时肉眼不可见,可将其 4000rpm 离心 2 分钟后使用)				
试剂三	显色剂	15mL×1 瓶	30mL×1 瓶	2~8℃保存
试剂四	浓缩终止剂	15mL×1 瓶	30mL×1 瓶	2~8℃保存
终止剂配制: 将浓缩终止剂用蒸馏水 10 倍稀释,用多少配多少				
试剂五	2mmol/L 丙酮酸钠标准液	1mL×1 支	1mL×1 支	2~8℃保存

二、所需仪器及试剂:

分光光度计及 1cm 光径比色皿(或酶标仪(440nm)及 96 孔板), 37℃水浴锅, 涡旋混匀器, 试管或离心管(5ml 以上容量), 蒸馏水, 生理盐水(或 PBS), 蛋白测定试剂(组织、细胞等样本用, 本公司有售)。

三、测定步骤:

1、样本前处理:

血清(浆)等液体样本: 直接使用(或稀释一定倍数后检测)。

细胞培养液: 取部分 4000rpm 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, 冰水浴下超声破碎(功率 100-300W, 运行 5 秒, 间隔 15 秒, 反复 3-5 次), 4000rpm 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, 4000rpm, 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**是先将植物组织用 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, 4000rpm, 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, 4000rpm, 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处理, 水分含量低或者干样推荐用方法一处理)

2、操作步骤:

	空白管	标准管	测定管	对照管
蒸馏水 (mL)	0.1	0.05		0.05
2μmol/mL 标准液 (mL)		0.05		
待测样本 (mL)			0.05	0.05
试剂一 (mL)	0.25	0.25	0.25	0.25
辅酶应用液 (mL)			0.05	
混匀, 37℃水浴 15 分钟				
试剂三 (mL)	0.25	0.25	0.25	0.25
混匀, 37℃水浴 15 分钟				
终止剂 (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5
混匀, 室温放置 3 分钟, 波长 440nm, 1cm 光径, 蒸馏水调零, 分光光度计测定各管吸光度值 A (或是每管吸取 200μL 反应液, 加到 96 孔板中, 酶标仪 440nm 处读数)				

注 1: 测试前需挑 1~2 例样本做浓度梯度(如 5、10、20、50、100、200 倍梯度稀释)预试, 选择测定 OD 值一对照 OD 值在 0.2 左右对应的样本浓度进行正式实验, 也可进行取样量梯度预试, 具体摸索方法见附录。

注 2: 按操作表从上往下的顺序操作, 不可先加辅酶再加基质液。

四、计算公式:

1、血清(浆)中乳酸脱氢酶的单位定义及计算公式:

定义: 每升血清(浆) 37℃与基质作用 15 分钟, 在反应体系中产生 1μmol 丙酮酸为 1 个活力单位。

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

2、组织中乳酸脱氢酶定义及计算公式:

定义: 每克组织蛋白 37℃与基质作用 15 分钟, 反应体系中产生 1μmol 丙酮酸为 1 个活力单位。

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

以上公式中:

C_{标准}: 标准品浓度, 2mmol/L (2μmol/mL);

V_{标准}: 标准品加入量, mL;

1000: mL→L 转化;

N: 样本测试前稀释倍数。

Cpr: 组织样本蛋白浓度, g/mL。

五、测定原理:

乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase LDH)能催化乳酸生成丙酮酸, 丙酮酸与 2,4-二硝基苯肼反应生成丙酮酸二硝基苯腙, 在碱性溶液中呈棕红色, 通过比色可求出酶活力。

六、测定意义:

乳酸脱氢酶 Lactate dehydrogenase (LDH) 是生物体能量代谢中的一种重要酶, LDH 质与量的改变, 直接影响到机体的能量代谢, 当机体各组织器官病变时, 其组织器官本身的 LDH 要发生改变, 并且可引起血液中 LDH 改变。

LDH 增高主要见于急性心肌梗塞、病毒性肝炎、肝硬化、肺梗塞、某些恶性肿瘤、骨骼肌病、有核红细胞骨髓内破坏(无效性造血)、白血病尤其是急性淋巴细胞型白血病、恶性贫血。

附录 I: 小鼠脑匀浆 LDH 最佳取样摸索

1、前处理: 取正常组小鼠脑组织用生理盐水制成 10%的匀浆上清, 再用生理盐水 1:49 稀释, 即 0.2%的匀浆液。

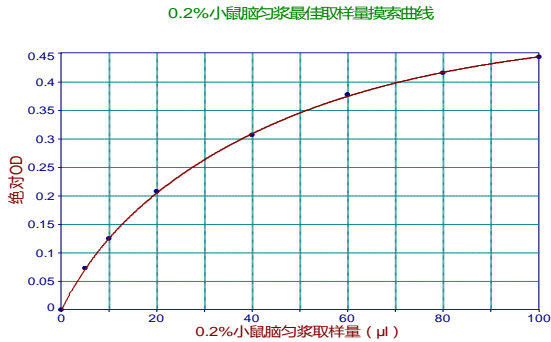
2、操作表:

	测定管	对照管
蒸馏水 (mL)		0.05
不同量的匀浆液 (mL)	a	a
生理盐水 (mL)	0.1-a	0.1-a
试剂一 (mL)	0.25	0.25
辅酶应用液 (mL)	0.05	
混匀, 37℃水浴 15 分钟		
试剂三 (mL)	0.25	0.25
混匀, 37℃水浴 15 分钟		
终止剂 (mL)	2.5	2.5
混匀, 室温放置 3 分钟, 波长 440nm, 光径 1cm, 蒸馏水调零, 分光光度计测定各管吸光度值 A。		

4、测定结果:

管号	0	1	2	3	4	5	6	7
0.2%的匀浆液 (mL)	0	0.005	0.010	0.020	0.040	0.060	0.080	0.100
生理盐水(mL)	0.1	0.095	0.090	0.080	0.060	0.040	0.020	0
测定 OD	0.068	0.159	0.222	0.308	0.41	0.484	0.524	0.56
对照 OD	0.068	0.086	0.097	0.1	0.103	0.106	0.108	0.116
绝对 OD	0	0.073	0.125	0.208	0.307	0.378	0.416	0.444

5、绘图如下:



参考取样量: 0.2%小鼠脑匀浆为 20~50μL, 最佳取样量为 35~40μL(实际操作时可固定取样量 50μL,将样本稀释成不同浓度做预试,选择测定-对照 OD 值差值在 0.2 左右的浓度进行正式实验)。

附录 II: 大鼠血浆 LDH 最佳取样量摸索

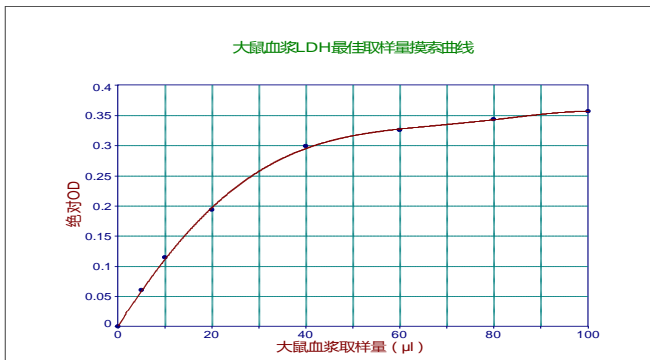
- 1、样本来源: 正常组大鼠眼眶取全血, 肝素抗凝后取血浆测定。
- 2、操作表:

	测定管	对照管
蒸馏水 (mL)		0.05
不同量大鼠血浆 (mL)	a	a
生理盐水 (mL)	0.1-a	0.1-a
试剂一 (mL)	0.25	0.25
辅酶应用液 (mL)	0.05	
混匀,37℃水浴 15 分钟		
试剂三 (mL)	0.25	0.25
混匀,37℃水浴 15 分钟		
终止剂 (mL)	2.5	2.5
混匀, 室温放置 3 分钟, 波长 440nm, 光径 1cm, 蒸馏水调零, 分光光度计测定各管吸光度值		

3、测定结果:

管号	0	1	2	3	4	5	6	7
血浆 (mL)	0	0.005	0.010	0.020	0.040	0.060	0.080	0.100
生理盐水(mL)	0.1	0.095	0.090	0.080	0.060	0.040	0.020	0
测定管 OD	0.068	0.157	0.226	0.346	0.526	0.632	0.736	0.804
对照管 OD	0.068	0.096	0.111	0.152	0.227	0.306	0.392	0.447
绝对 OD	0	0.061	0.115	0.194	0.299	0.326	0.344	0.357

4、大鼠血浆检测 LDH 时最佳取样量的摸索曲线 (水浴温度为 37℃):



(参考取样量: 大鼠血浆为 10~30μL, 最佳取样量为 20μL(实际操作时可固定取样量 50μL,将样本稀释成不同浓度做预试,选择测定-对照 OD 值差值在 0.2 左右的浓度进行正式实验))

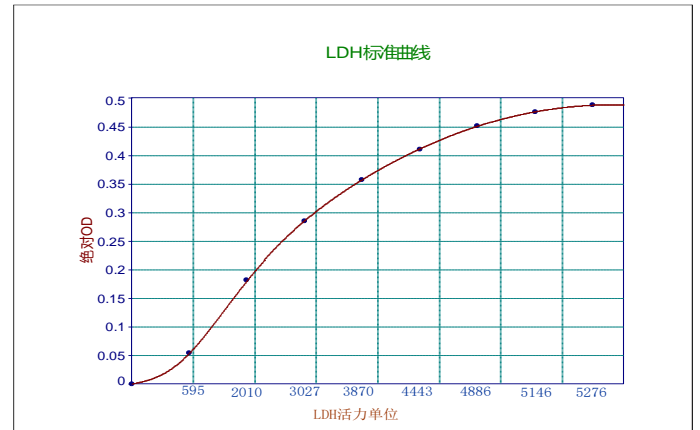
附录 III: LDH 标准曲线的制备 (仅供参考)

(以 ROCHE 公司的乳酸脱氢酶 LDH 标准品作标准曲线)

7.5U/mL LDH 标准品的配制: 取 10μL LDH 标准液 (37℃时活力为 7500U/mL) 稀释并定容至 10mL。

管号	0	1	2	3	4	5	6	7	8
7.5U/mL 标准品 (mL)	0	0.005	0.010	0.015	0.020	0.025	0.030	0.035	0.040
蒸馏水 (mL)	0.05	0.045	0.040	0.035	0.030	0.025	0.020	0.015	0.010
试剂一 (mL)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
辅酶应用液 (mL)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
混匀,37℃水浴 15 分钟									
试剂三 (mL)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
混匀,37℃水浴 15 分钟									
终止剂 (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
混匀, 静置 3 分钟, 440nm 处, 1cm 光径, 蒸馏水调零, 测各管吸光度									
相当于活力单位 (U/mL)	0	595	2010	3027	3870	4443	4886	5146	5276
吸光度参考值	0.071	0.125	0.252	0.355	0.428	0.481	0.522	0.546	0.558
绝对吸光度	0	0.055	0.182	0.285	0.358	0.411	0.452	0.476	0.488

以所测得的吸光度为纵坐标, 以相应的 LDH 活力单位为横坐标, 绘制标准曲线:



注: 上述标准曲线客户不用制作 (LDH 纯酶标准品试剂盒里不提供), 仅供参考, 如需制作请自备该纯酶标准品。