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。

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:

编号 / 名称	GCTE0157 100T	Storage
试剂(A): NADH	2 支	-20℃ 避光
试剂(B): LD-P Assay Buffer	250ml	RT
试剂(C): 丙酮酸溶液	2×1.5ml	4℃
试剂(D): 丙酮酸稀释液	30ml	RT
试剂(E): LDH 保护剂	1 支	4℃ 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℃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、配制 LDH 检测储存液(10×):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×);-20℃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×),按 LDH 检测储存液(10×):LD-P Assay Buffer =1:9 的比例混合,即为 LDH 检测工作液;-20℃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℃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℃孵育 5min。	
丙酮酸工作液(37℃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 $A_{测定1}$。

每 1min 读取各管吸光度,记录为 $A_{测定2}$。注意:由于酶促反应时间极短,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。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℃
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(Δ*A*/min)。

计算:

手工比色计算公式：LDH(U/L)=Δ*A*/min×(10^6/6220)×(2.25/0.05)=Δ*A*/min×7235

式中：Δ*A*/min=($A_{测定1}-A_{测定2}$)/1

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：LDH(U/L)=Δ*A*/min×(10^6/6220)×(296/10)=Δ*A*/min×4758.8

式中：Δ*A*/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 LD_4 和 LD_5 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
GCCA0005	氨苄青霉素溶液(Ampicillin,50mg/ml)
GCDH0006	苏木素伊红(HE)染色液(醇溶)
GCDP0013	GUS 染色液(即用型)
GCNR0002	Trizol(总 RNA 提取试剂)
GCTC0699	植物总糖和还原糖检测试剂盒(DNS 比色法)
GCTC0713	葡萄糖检测试剂盒(GOD-POD 比色法)
GCTC1167	尿素(Urea)检测试剂盒(脲酶波氏比色法)