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：乳酸+NAD^+↔丙酮酸+NADH+H^+，其中：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(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:

编号 / 名称	GCTE0159 50T	Storage
试剂(A): 丙酮酸标准(5mmol/L)	1ml	4℃ 避光
试剂(B): LDH Assay Buffer	25ml	4℃ 避光
试剂(C): NAD Buffer	2ml	-20℃
试剂(D): 二硝基苯肼溶液	15ml	4℃ 避光
试剂(E): 碱性显色液	50ml	RT
试剂(F): LDH 保护剂	1 支	4℃ 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:

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 $A_{空白}$、$A_{标准}$、$A_{对照}$、$A_{测定}$)。

计算： LDH 活性单位的定义：以 100ml 血清，在 37℃孵育 15min， LDH 催化底物产生 1μmol 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(μmol/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(μmol/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)×(c×V)=100cN

其他样本乳酸脱氢酶的活性计算：LDH（U/mL）=1/(V/N)×(c×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(μmol/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、 LD_4和 LD_5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。

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)

