

乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒(精简版)

(货号：A020-2 微板法)

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、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、试剂盒组成及配制: (试剂盒有效期 3 个月)

	组 分	A020-2-1 48T	A020-2-2 96T	保 存
试剂一	基质缓冲液	3mL×1 瓶	5mL×1 瓶	2~8℃
试剂二	辅酶 I	粉剂×1 支	粉剂×1 支	-20℃
	辅酶 I 溶液配制: 使用前每支粉剂加 1.3mL 双蒸水溶解, 溶解后冷冻可保存 2 周, 如需多次使用建议分装冷冻 (防止反复冻融) (注: 辅酶 I 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 4000 转/分钟离心 2 分钟后使用)			
试剂三	2, 4-二硝基苯肼	3mL×1 瓶	5mL×1 瓶	2~8℃避光
试剂四	4mol/L NaOH	3mL×1 瓶	5mL×1 瓶	2~8℃
	0.4mol/LNaOH 溶液配制: 将 4mol/LNaOH 溶液用双蒸水 10 倍稀释, 需多少配多少			
试剂五	2μmol/mL 丙酮酸钠标准液	1mL×1 支	1mL×1 支	2~8℃
	0.2μmol/mL 丙酮酸钠标准液 配制: 取 2μmol/mL 丙酮酸钠标准液用双蒸水 10 倍稀释, 现用现配			
附送 96 孔板一块(空白板,可自备使用)				

三、测试所需仪器和试剂:

含 440nm 波长的酶标仪及 96 孔板 (附送一块)、37℃ 水浴锅或恒温箱、台式低速离心机、各种规格移液器、烧杯或试剂瓶 (用于配制 0.4M 氢氧化钠, 空试剂瓶本公司有售)、双蒸水、生理盐水 (0.9%) 或 PBS (0.1M)、涡旋混匀器、蛋白测定试剂 (组织及细胞样本用, 本公司有售)。

四、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。

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 4000 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 10^6 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/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。

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**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, 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
双蒸水(μL)	20	4		4
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(μL)			4	
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				
试剂四(μL)	200	200	200	200
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。				

***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, 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、对照孔中不加试剂二(辅酶 I)。

2、严格按照说明书操作, 不可先加辅酶 I 再加基质液。

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:

1、血清(浆)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。

计算公式:

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

N: 样本测试前稀释倍数;

C_{标准}: 标准液浓度, 0.2μmol/mL;

1000: 单位换算, mL→L;

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。

计算公式:

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

C_{标准}: 标准液浓度, 0.2μmol/mL;

Cpr: 样本蛋白浓度, gprot/mL (prot 指蛋白)。

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、辅酶 I 加样量比较少,所以加入时尽量靠近孔底液面处,这样加完后轻轻振荡孔板就能使其与底部液体接触。
- 6、加样时要尽量避免产生气泡。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。

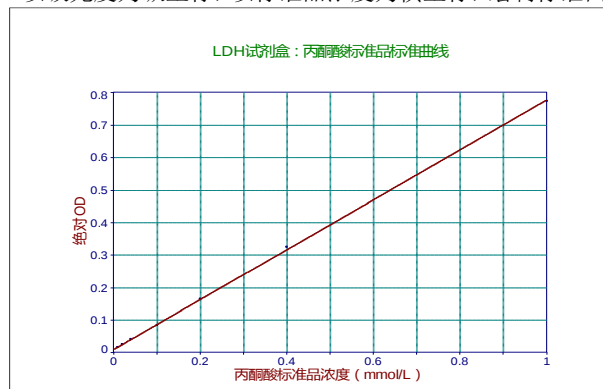
附录 I：标准曲线制备（可不作）

1、操作：

将 2 μ mol/mL 的丙酮酸钠标准液用双蒸水分别稀释 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

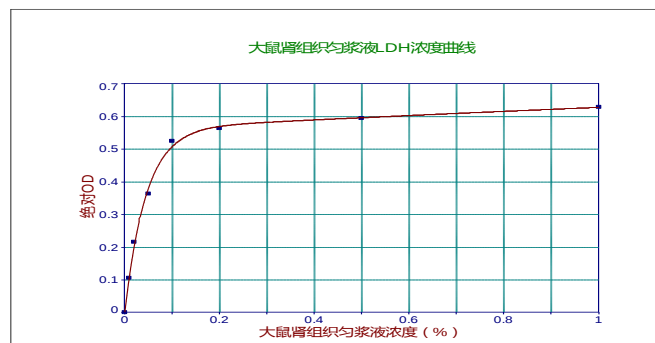
1、样本：正常组大鼠肾组织

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,最佳绝对吸光度在控制在 0.2~0.3 之间,根据您的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 50~100 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)

