

乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒(LD-L 比色法)说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

产品简介：

乳酸脱氢酶(lactatedehydrogenase, LDH 或 LD)属于氧化还原酶，能够催化氢氧原子或电子从一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： $\text{乳酸} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{丙酮酸} + \text{NADH} + \text{H}^+$ 。其中： $\text{L} \rightarrow \text{P}$ 为正向反应； $\text{P} \rightarrow \text{L}$ 为逆向反应。

乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒(LD-L 比色法)是利用乳酸脱氢酶催化上述正反应，即 $\text{L-乳酸} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{丙酮酸} + \text{NADH} + \text{H}^+$ ，在上述反应过程中乳酸氧化成丙酮酸，同时 NAD^+ 氧化成 NADH ，引起 340nm 处吸光度的升高，其升高速率与样品中 LDH 活性呈正比关系，通过分光光度计或自动分析仪检测 340nm 处吸光度升高速率，通过计算获得乳酸脱氢酶的活性。该 LD-L 法的优点是：1、乳酸盐和 NAD^+ 底物溶液的稳定性比 LD-P 法中的丙酮酸和 NADH 底物溶液好；2、线性速率反应时间范围较宽；3、重复性比 LD-P 法和二硝基苯肼法好；4、准确性比二硝基苯肼法好；5、适用于自动分析仪。该试剂盒仅用于科研领域，不宜用于临床诊断或其他用途。

产品组成：

名称	规格	保存条件
乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒	100T	4℃
试剂(A):NAD	2 支	-20℃避光
试剂(B):LD-LAssaybuffer	200ml	4℃避光
试剂(C):LDH 保护剂	1 支	4℃避光
试剂(D):LDH 保护稀释液	1.5ml	RT
使用说明书	1 份	
有效期	1 年	

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，可以直接用于本试剂盒的测定，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 检测工作液：取 1 支 NAD，按 NAD：LD-LAssaybuffer=1 支：100ml 的比例混合，即为 LDH 检测工作液，即配即用，不宜久置。

3、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)	0.1
LDH 检测工作液(37℃提前预热)	2
混匀，37℃孵育 30s。	

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}。3min 后立即以分光光度计 340nm 处读取各管吸光度，记录为 A_{测定2}。注意：由于酶促反应时间较短，建议加样时间越短越好，其反应基本在 1~3min 内，其后反应趋于平缓，由于检测仪器、操作手法以及样品酶活性高低等条件的不同，参考值范围会有波动。

4、自动分析仪测定：如果样品中的浓度过高，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。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℃
波长	340nm
延迟时间	90s
检测时间	180s
待测样品	15 μl
LDH 检测工作液	300 μl

记录待测样品管吸光度的升高速率(ΔA/min)。

计算：

手工比色计算公式: $LDH(U/L) = \Delta A/min \times (106/6220) \times (2.1/0.1) = \Delta A/min \times 3376$

式中: $\Delta A/min = (A_{\text{测定1}} - A_{\text{测定2}}) / 3$

6220=NADH 的吸光度

2.1=反应液的总体积(ml)

0.1=待测样品体积(ml)

自动分析仪计算公式: $LDH(U/L) = \Delta A/min \times (106/6220) \times (315/15) = \Delta A/min \times 3376$

式中: $\Delta A/min = \text{测定的 } 340nm \text{ 吸光度的升高速率}$

6220=NADH 的吸光度

315=反应液的总体积(μl)

15=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	109~245U/L
-------	------------

注意事项:

- 1、处理后的样品应及时检测, 否则 LD4 和 LD5 易失效。
- 2、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。
- 3、避免使用溶血样品。
- 4、为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。