

乳酸脱氢酶 (Lactate Dehydrogenase, LDH) 检测试剂盒微板法

使用说明书

产品货号：BP10235W

注意：请在试剂盒保质期内使用，具体保质期见外包装标签。

本产品仅供科学研究使用，不能用于临床诊断。

检测范围：0.1-40U/L

灵敏度：0.1U/L

有效期：6个月

保存温度：-20℃

检测原理:

乳酸脱氢酶(LDH)催化乳酸和 NAD^+ 反应产生丙酮酸和 NADH , NADH 在 PMS 作用下, 将电子传递给 WST-8, 生产黄色的产物, 其在 450nm 有特征吸收峰, 通过检测该黄色物质在 450nm 的增加速率, 进而计算出乳酸脱氢酶活性的大小。

注意事项:

1. 不能使用过期产品, 不同货号 and 批号组分不得混用。
2. 本试剂开封后请尽快使用, 以免空气、采样污染引起试剂变质。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 如果可能传播疾病, 所有的样品都应管理好, 按照规定的程序处理样品和检测装置。
5. 试剂严格按保存条件保存, 不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂, 使用前请先离心, 以免量取不到足够量的试剂。试剂盒中如有提供粉剂, 使用前请甩几下, 使粉剂落入底部。

试剂名称	规格（48T/40S）	规格（96T/88S）	保存条件
试剂一	60mL×1 瓶	120mL×1 瓶	-20°C
试剂二	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20°C
试剂三	0.65mL×1 瓶	1.3mL×1 瓶	-20°C
试剂四	1mL×1 瓶	2mL×1 瓶	-20°C，避光
标准品	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20°C

试剂盒组分：

所需仪器耗材及试剂：

离心机、酶标仪、可调式移液器、蒸馏水、恒温箱。

样本处理及要求:

1. **试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围**, 建议实验前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定, 根据预实验的结果, 结合本试剂盒的线性范围: 1-100U/L, 如果样品中待测物浓度过高或过低, 请对样本做适当的稀释或浓缩, 样本的稀释液为试剂一。
2. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中, 建议做预实验验证其检测有效性
3. **组织样本:** 按照样本质量(g): 体积(mL)为 1:10 的比例加入匀浆介质(建议取 0.1g 组织样本, 加入 1mL 试剂一)进行机械匀浆。4° C, 10000 g 离心 10min, 取上清待测, 如果需要检测蛋白浓度, 可留取部分上清进行蛋白浓度测定。
4. **细菌/细胞样本:** 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细胞数量(10^4 个):提取液体积(mL)为 500~1000: 1 的比例(例取 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一; 超声波破碎细菌或细胞(冰浴, 功率 20%或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 10000 g, 4° C 离心 10min, 取上清待测, 留取部分上清进行蛋白浓度测定。
5. **血清(浆)等液体样本:** 直接测定, 若混浊, 则离心后取上清测定。

检测前准备工作:

1. 请提前取出试剂盒，平衡至室温。
2. **试剂二工作液配制:** 取一瓶试剂二使用前加 0.6mL 蒸馏水溶解，临用前配制，-20℃避光可保存 7 天。
3. **反应工作液配制:** 反应工作液配制：将上述溶解好的试剂，按试剂一：试剂二工作液：试剂三：试剂四=13：1：1：1 的体积比混匀，实验前按需现配现用，避光保存。
4. **标准品配制:** 取一支标准品粉剂用 2mL 的蒸馏水充分溶解，混合均匀，为 5mmol/L 标准品。临用前配制，-20℃避光可保存 7 天。取 5mmol/L 标准品按照下表稀释成不同浓度的标准品工作液：0 μmol/L、50 μmol/L、100 μmol/L、150 μmol/L、200 μmol/L、250 μmol/L、300 μmol/L、400 μmol/L。
(注：配制目标浓度的标准品工作液时，每次请根据表格从标准品母液中取对应的体积与相应稀释液混合均匀后使用。)

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(μmol/L)	0	50	100	150	200	250	300	400
5mmol/L 标准品(μL)	0	10	20	30	40	50	60	80
试剂一(μL)	1000	990	980	970	960	950	940	920

也可根据实际样本来调整标准品浓度。按照标准孔加样体系操作，依据结果即可制作标准曲线；本说明书中的标曲是用试剂一稀释得出，若选取其他稀释液可选择重做标曲。

操作步骤:

1. 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 450nm。
2. 样本测定 (在 96 孔板中依次加入):

试剂名称(μL)	标准孔	测定孔
样本		40
不同浓度的标准品	40	
反应工作液	160	160

混匀, 37°C 孵育 10min, 酶标仪震板 5s, 在 450nm 波长处检测各孔 OD 值。

实验结果结算:

1. 标准品拟合曲线: $y=ax+b$ 。
2. 按样本鲜重计算:

单位定义: 37° C 条件下, 每克组织每分钟催化底物产生 1 μ mol 的 NADH 所需要的酶量为一个活力单位。

$$\text{LDH 活力(U/kg 鲜重)} = (\Delta A - b) \div a \div T \times N \div (W \div V)$$

3. 按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 37° C 条件下, 每克组织蛋白或细胞蛋白每分钟催化底物产生 1 μ mol 的 NADH 所需要的酶量为一个活力单位。

$$\text{LDH 活力(U/gprot)} = (\Delta A - b) \div a \div T \times N \div Cpr$$

4. 按照液体体积计算:

单位定义: 37° C条件下, 每升液体每分钟催化底物产生1 μ mol的NADH所需要的酶量为一个活力单位。

$$\text{LDH活力(U/L)} = (\Delta A - b) \div a \div T \times N$$

注:

y: 标准孔 OD 值-空白孔 OD 值
(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

ΔA : 样本孔 OD 值 - 空白孔 OD 值
(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

b: 标准曲线截距

N: 样本的稀释倍数

a: 标准曲线斜率

W: 样本质量, g

x: 标准品的浓度

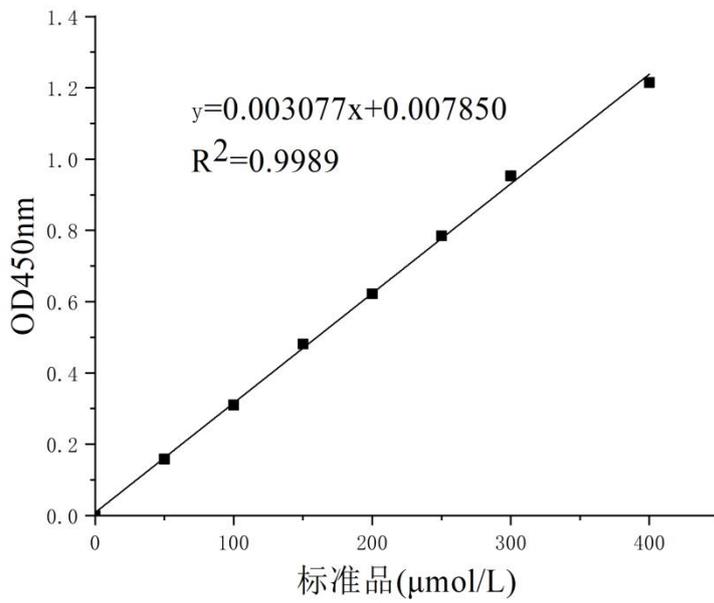
Cpr: 待测样本的蛋白浓度(g prot/L)

T: 反应时间, 10min

V: 匀浆加入试剂一的体积, mL

参考曲线:

$y=0.003077x+0.007850, R^2=0.9989$, x 是标准品的浓度 ($\mu\text{mol/L}$), y 是 ΔA 。



注意：本图仅供参考，应以每次实验数据所绘制标准曲线计算样本含量。