

乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒

微板法 48T

一、试剂盒组成及配制：

	组 份	48T	96T	保 存
试剂一	基质缓冲液	3ml×1 瓶	5ml×1 瓶	2~8℃ 保存
试剂二	辅酶 I	粉剂×1 支	粉剂×1 支	-20℃ 冷冻保存
	辅酶 I 溶液配制： 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）			
试剂三	2, 4-二硝基苯肼	3ml×1 瓶	5ml×1 瓶	2~8℃ 避光保存
试剂四	4mol/L NaOH	3ml×1 瓶	5ml×1 瓶	2~8℃ 保存
	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	2 μ mol/ml 丙酮酸标准液	1ml×1 支	1ml×1 支	2~8℃ 保存
	0.2 μ mol/ml 丙酮酸标准应用液配制： 取 2 μ mol/ml 丙酮酸标准液用双蒸水 10 倍稀释，现用现配			
0.2 μ mol/ml 丙酮酸标准应用液配制： 取 2 μ mol/ml 丙酮酸标准液用双蒸水 10 倍稀释，现用现配				

二、样本采集及保存：

- 1、本试剂盒适用于检测动物血清、组织、灌流液、细胞培养液等中乳酸脱氢酶(LDH)的力。
- 2、按常规采集样本，样本可以是血清、血浆（肝素抗凝为佳）、细胞培养上清。组织或细胞（按实验方法学的样本前处理）。
- 3、如不能及时检测，请将样本放置于-20℃以下保存。
- 4、测定前的样本前处理需参照实验方法学。

三、测定步骤：

	空白孔	标准孔	测定孔	对照孔
双蒸水(μl)	25	5		5
0.2 μ mol/ml 丙酮酸标准液(μl)		20		

待测样本(μl)			20	20
基质缓冲液(μl)	25	25	25	25
辅酶 I (μl)			5	
混匀, 37℃温浴 15 分钟				
2, 4-二硝基苯肼(μl)	25	25	25	25
混匀, 37℃温浴 15 分钟				
0.4mol/L NaOH 溶液(μl)	250	250	250	250
混匀, 室温放置 5 分钟, 波长 450nm, 酶标仪测定吸光度值。				

*参考取样量: 0.01%小鼠脑组织匀浆取 5~20μl (根据样本活力高低确定取样量), 人血清 10 倍稀释取 10~30μl (根据样本活力高低确定取样量)。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。

四、测定原理



根据比尔定律, 可测乳酸脱氢酶 (LDH) 活性。

五、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, 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, 所以最好加入时将吸头在反应液中反复吸打几次, 并注意更换吸头。

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测定。

7、本试剂盒仅用于科研、实验室。

附录 I：标准曲线制备

1、前处理：

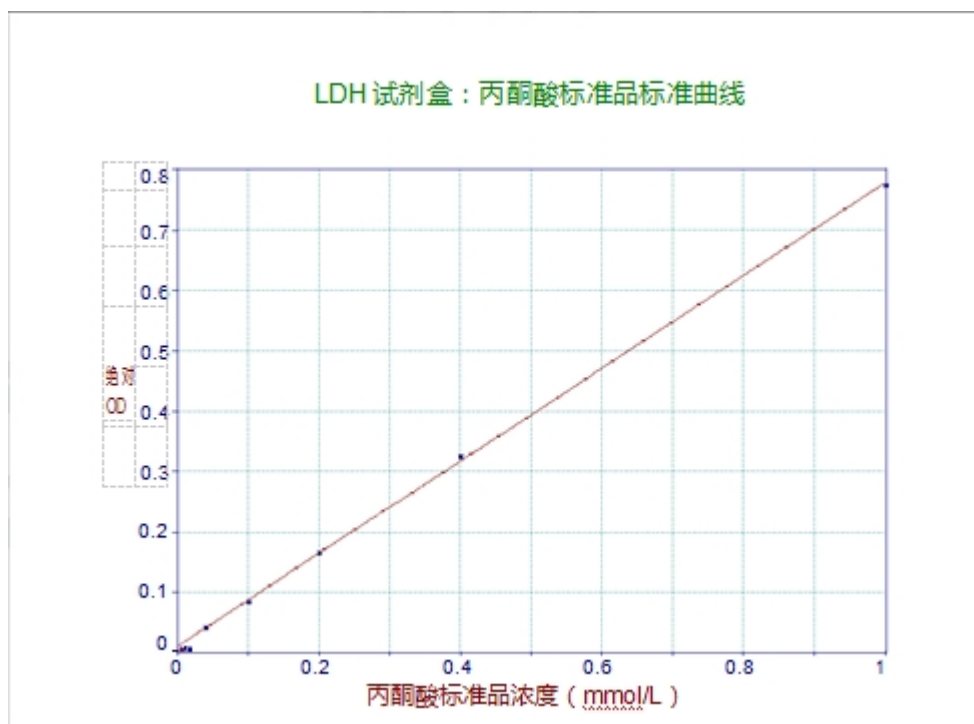
将 2 μ mol/ml 的丙酮酸标准品用双蒸水分别 200 倍、100 倍、50 倍、20 倍、10 倍、5 倍、2 倍稀释后按照操作表制作标准曲线。

2、操作表：

	空白孔	标准孔
双蒸水(μ l)	25	5
不同浓度丙酮酸标准液(μ l)		20
基质缓冲液(μ l)	25	25
混匀，37 $^{\circ}$ C 温浴 15 分钟		
2-4-二硝基苯肼(μ l)	25	25
混匀，37 $^{\circ}$ C 温浴 15 分钟		
0.4mol/l 氢氧化钠溶液(μ l)	250	250
混匀，室温静置 5 分钟，波长 450nm，酶标仪测定吸光度值。		

3、绘图如下：

以所测得的吸光度为纵坐标，以相应的单位为横坐标，绘制标准曲线。



附录 II：大鼠血浆 LDH 取样浓度摸索

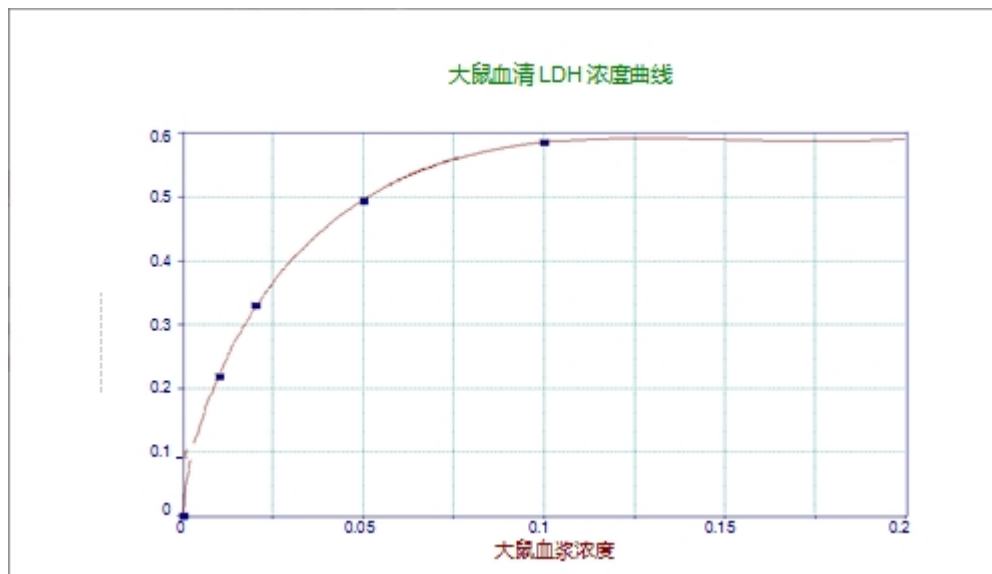
- 试剂及配制：**由南京建成生物工程研究所提供并按说明书配制。
- 样本来源：**以本所大鼠血浆为例，进行 LDH 检测最佳取样浓度摸索。
- 操作表：**（将原大鼠血浆浓度视为 1，则 100 倍稀释后浓度视为 0.01，以此类推其他相应浓度）

	空白孔	标准孔	测定孔	对照孔
双蒸水(μl)	25	25	5	5
0.2 μ mol/ml 丙酮酸标准液(μl)		20		
待测样本(μl)			20	20
基质缓冲液(μl)	25	25	25	25
辅酶 I (μl)			5	
混匀，37℃温浴 15 分钟				
2, 4-二硝基苯肼(μl)	25	25	25	25
混匀，37℃温浴 15 分钟				
0.4mol/L NaOH 溶液(μl)	250	250	250	250
混匀，室温放置 5 分钟，波长 450nm，酶标仪测定吸光度。				

4、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，最佳取样量为 20 μ l。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）



附录III：大鼠肾匀浆 LDH 取样浓度摸索

1、试剂及配制：由南京建成生物工程研究所提供并按说明书配制。

2、样本来源：正常组大鼠肾组织

3、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%。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，本所有售）。

4、操作表：

	空白孔	标准孔	测定孔	对照孔
双蒸水(μ l)	25	5		5
0.2 μ mol/ml 丙酮酸标准液(μ l)		20		

待测样本(μl)			20	20
基质缓冲液(μl)	25	25	25	25
辅酶 I (μl)				
混匀, 37℃温浴 15 分钟				
2, 4-二硝基苯肼(μl)	25	25	25	25
混匀, 37℃温浴 15 分钟				
0.4mol/L NaOH 溶液(μl)	250	250	250	250
混匀, 室温放置 5 分钟, 波长 450nm, 酶标仪测定吸光度。				

5、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

