



上海源叶生物科技有限公司  
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd  
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248  
网址: [www.shyuanye.com](http://www.shyuanye.com)  
邮箱: shyyysw@sina.com

## 乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒(二硝基苯胍微板法)

### 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:  $\text{乳酸} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{丙酮酸} + \text{NADH} + \text{H}^+$ , 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(二硝基苯胍微板法)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,丙酮酸与二硝基苯胍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,酶标仪检测 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:

| 名称 \ 编号                 | R21832<br>100T | Storage |
|-------------------------|----------------|---------|
| 试剂(A): 丙酮酸标准            | 22mg           | RT      |
| 试剂(B): LDH Assay Buffer | 6ml            | 4°C 避光  |
| 试剂(C): NAD              | 1 支            | -20°C   |
| 试剂(D): 二硝基苯胍溶液          | 3ml            | 4°C 避光  |
| 试剂(E): 碱性显色液            | 10ml           | RT      |
| 试剂(F): LDH 保护剂          | 1 支            | 4°C 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、提取液(PBS 或 PBS-Triton 溶液(0.5%))
- 2、离心管、离心机、恒温箱或水浴锅、超声波破碎仪、酶标仪、96 孔板

### 操作步骤(仅供参考):

#### 1、准备样品:

- (1) 组织样本: (a) 称取约 0.1g 组织加入研钵中,加入 1ml 提取液,进行冰浴匀浆; (b) 12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清液,置冰上待测。



上海源叶生物科技有限公司  
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd  
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248  
网址: [www.shyuanye.com](http://www.shyuanye.com)  
邮箱: shyyysw@sina.com

【注】：若增加样本量，可按照组织质量(g)：提取液体积(ml)为 1:5~10 的比例提取。

(2) 细菌/细胞样本：(a) 收集细菌或细胞到离心管内，离心弃上清；(b) 取  $5 \times 10^6$  个细菌或细胞加入 1ml 提取液，冰浴超声波破碎细菌或细胞(强度 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次)；(c) 12000rpm，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照每  $0.5 \sim 1 \times 10^7$  个细菌/细胞加入 1ml 提取液进行提取。红细胞内 LDH 活性比血清酶活性高约 100 倍，故不能使用溶血样本。

(3) 液体样本：澄清的液体直接检测；若浑浊则离心后取上清检测。

【注】：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。LD<sub>4</sub> 和 LD<sub>5</sub> 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。脑脊液内 LDH 活性较低，应直接加入体系中进行测定，不建议稀释。

(4) 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。

2、配制 NAD 溶液：取 1 支 NAD(粉末)，溶解于 1.5ml 蒸馏水，即成。

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、稀释标准品：取丙酮酸标准 1 支(22mg)，准确加入蒸馏水 2ml，充分混匀，即配制成丙酮酸标准(50mmol/L)，4℃保存备用。临用前，按丙酮酸标准(50mmol/L)：LDH Assay Buffer=1：99 的比例混合，即为丙酮酸标准(0.5mmol/L)，再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  |

5、LDH 酶促：按照下表设置空白管、标准孔、对照孔、测定孔，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：μl)       | 空白孔 | 标准孔 | 对照孔 | 测定孔 |
|------------------|-----|-----|-----|-----|
| 蒸馏水              | 7.5 | 7.5 | 5   | —   |
| 系列丙酮酸标准(1~6 号)   | —   | 25  | —   | —   |
| 待测样品(如血清等)       | —   | —   | 2.5 | 2.5 |
| LDH Assay buffer | 25  | —   | 25  | 25  |
| 混匀，37℃孵育 5min。   |     |     |     |     |
| NAD 溶液           | —   | —   | —   | 5   |



上海源叶生物科技有限公司  
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd  
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248  
网址: [www.shyuanye.com](http://www.shyuanye.com)  
邮箱: shyyysw@sina.com

|                                     |     |     |     |     |
|-------------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| 混匀, 37°C 孵育 15min, 空白和标准无须 37°C 孵育。 |     |     |     |     |
| 二硝基苯肼溶液                             | 25  | 25  | 25  | 25  |
| 混匀, 37°C 孵育 15min。                  |     |     |     |     |
| 碱性显色工作液                             | 250 | 250 | 250 | 250 |

【注】: 酶促反应中组织匀浆液取样量为 5~30ul, 应相应增加其余各孔中蒸馏水的用量。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。碱性显色液有一定腐蚀性, 请小心操作。

6、LDH 测定: 混匀, 室温放置 5min, 酶标仪 440nm 处测定各孔吸光度(记为  $A_{\text{空白}}$ 、 $A_{\text{标准}}$ 、 $A_{\text{对照}}$ 、 $A_{\text{测定}}$ )。检测应在 3~15min 内完成, 否则吸光度会下降。

**计算:** LDH 活性单位的定义: 以 100ml 血清, 在 37°C 孵育 15min, LDH 催化底物产生 1 $\mu$ mol 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( $\mu$ mol/mL)为横坐标, 以( $A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ )吸光度之差值为纵坐标, 绘制标准曲线, 用( $A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ )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( $\mu$ mol/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:  $\text{LDH (U/100 mL)} = 100/(V/N) \times (c \times V) = 100cN$

其他样本乳酸脱氢酶的活性计算:  $\text{LDH (U/mL)} = 1/(V/N) \times (c \times V) = cN$

其中:  $A_{\text{标准}}$  = 标准管的吸光度

$A_{\text{空白}}$  = 空白管的吸光度

$A_{\text{测定}}$  = 测定管的吸光度

$A_{\text{对照}}$  = 对照管的吸光度

$V$  = 反应体系中待测样品的加入量 = 2.5 $\mu$ l = 0.0025(mL)

$c$  = 样品产生的丙酮酸浓度( $\mu$ mol/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、处理后的样品应及时检测, 否则易失效。
- 2、为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 3、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。