

乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒说明书(精简版)

(货号: A020-1 比色法)

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、试剂组成及配制:

	试剂组成	A020-1-1 50管/24样	A020-1-2 100管/48样	保存条件
试剂一	基质缓冲液	15mL×1瓶	30mL×1瓶	2~8℃保存
试剂二	辅酶 I	粉剂×2支	粉剂×3支	-20℃保存
辅酶 I 应用液的配制: 每支粉剂加 1.3mL 双蒸水溶解, 溶解后冷冻保存 2 周, 如需多次使用建议分装冷冻 (防止反复冻融)。(注: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	15mL×1瓶	30mL×1瓶	2~8℃保存
试剂四	4mol/L NaOH 溶液	15mL×1瓶	30mL×1瓶	2~8℃保存
0.4mol/L NaOH 溶液配制: 将 4mol/L NaOH 溶液用双蒸水 10 倍稀释, 用多少配多少, 现用现配				
试剂五	2mmol/L (μmol/mL) 丙酮酸钠标准液	1mL×1支	1mL×1支	2~8℃保存

[注]: 保存条件及有效期:2~8℃密封保存, 有效期 3 个月。

二、测试所需仪器和试剂:

含 440nm 波长的分光光度计及 1cm 光径比色皿、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 的氢氧化钠, 空试剂瓶本公司有售)、一次性塑料试管或离心管 (5ml 或以上规格)、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)。

二、操作表:

	空白管	标准管	测定管	对照管
双蒸水 (mL)	0.05+a	0.05		0.05
2μmol/mL 标准液 (mL)		a		
待测样本 (mL)			a	a
基质缓冲液 (mL)	0.25	0.25	0.25	0.25
辅酶 I 应用液 (mL)			0.05	
混匀, 37℃ 水浴 15 分钟				
2, 4-二硝基苯肼 (mL)	0.25	0.25	0.25	0.25
混匀, 37℃ 水浴 15 分钟				
0.4mol/L NaOH 溶液 (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5
混匀, 室温放置 3 分钟, 波长 440nm, 1cm 光径, 双蒸水调零, 测定各管吸光度值				

***参考取样量:** 0.2% 小鼠脑组织匀浆取 10~50 μL, 大鼠血清取 10~30 μL。若样本中 LDH 酶活力太大 (测定 OD 值 - 对照 OD 值 > 0.2), 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、对照管中不加辅酶 I 应用液。

2、严格按照说明书操作, 不可先加辅酶 I 再加基质液。

三、计算公式:

1、血清 (浆) 中乳酸脱氢酶的单位定义及计算公式:

定义: 每升血清 (浆) 37℃ 与基质作用 15 分钟, 在反应体系中产生 1 μmol 丙酮酸为 1 个活力单位。

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

C_{标准}: 标准品浓度, 2mmol/L (2 μmol/mL);

V_{标准}: 标准品加入量, mL;

V_样: 样本加入量, mL;

1000: mL → L 转化;

N: 样本测试前稀释倍数。

2、组织中乳酸脱氢酶定义及计算公式:

定义: 每克组织蛋白 37℃ 与基质作用 15 分钟, 反应体系中产生 1 μmol 丙酮酸为 1 个活力单位。

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

C_{标准}: 标准品浓度, 2mmol/L (2 μmol/mL);

Cpr: 组织样本蛋白浓度, gprot/mL (prot 指蛋白)。

四、测定原理:

乳酸脱氢酶 (Lactate dehydrogenase LDH) 能催化乳酸生成丙酮酸, 丙酮酸与 2,4-二硝基苯肼反应生成丙酮酸二硝基苯腙, 在碱性溶液中呈棕红色, 通过比色可求出酶活力。

五、测定意义:

乳酸脱氢酶 Lactate dehydrogenase (LDH) 存在于人体各组织器官中。LDH 是机体能量代谢中的一种重要酶, LDH 质与量的改变, 直接影响到机体的能量代谢, 当机体各组织器官病变时, 其组织器官本身的 LDH 要发生改变, 并且可引起血液中 LDH 改变。

LDH 增高主要见于急性心肌梗塞、病毒性肝炎、肝硬化、肺梗塞、某些恶性肿瘤、骨骼肌病、有核红细胞骨髓内破坏 (无效性造血)、白血病尤其是急性淋巴细胞型白血病、恶性贫血。

在急性心肌梗塞 LDH 水平于发作后 12~24h 开始升高, 48~72h 达高峰, 升高可达 10 天。恶性肿瘤仅在发展到相当阶段时才升高, 故对肿瘤早期诊断意义不大。某些肿瘤所致的胸腹水中, LDH 活力往往升高。

此外, 脑脊液中 LDH 总活力升高出现在蛛网膜下出血及脑血管血栓形成并出血。脑或脑膜肿瘤不升高, 而原发于其它部位转移入脑的可升高。

慢性肾小球性肾炎、系统性红斑狼疮、糖尿病性肾硬变、膀胱及肾脏恶性肿瘤病人尿中 LDH 活力升高达正常人的 3-6 倍。但尿中尿素及小分子肽类可抑制酶活力, 尿 PH 偏低也可能使 LDH 灭活。

在具有尿毒症的慢性肾病患者, 血清 LDH 一般正常, 经透析治疗后活性上升, 可能与血清中 LDH 的抑制剂尿素、草酸盐被除去有关。

附录 I: LDH 标准曲线的制备

(以 ROCHE 公司的乳酸脱氢酶 LDH 标准品作标准曲线)

7.5U/mL LDH 标准品的配制: 取 10 μL LDH 标准液 (37℃ 时活力为 7500U/mL) 稀释并定容至 10mL。

管号	0	1	2	3	4	5	6	7	8
7.5U/mL 标准品 (mL)	0	0.005	0.010	0.015	0.020	0.025	0.030	0.035	0.040
双蒸水 (mL)	0.04	0.035	0.030	0.025	0.020	0.015	0.010	0.005	0
试剂一 (mL)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
混匀, 37℃ 水浴 15 分钟									
试剂三 (mL)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
混匀, 37℃ 水浴 15 分钟									
0.4mol/L NaOH (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
混匀, 静置 3 分钟, 440nm 处, 1cm 光径, 双蒸水调零, 测各管吸光度									
相当于 LDH 单位	0	595	2010	3027	3870	4443	4886	5146	5276
吸光度参考值	0.071	0.125	0.252	0.355	0.428	0.481	0.522	0.546	0.558
绝对吸光度	0	0.055	0.182	0.285	0.358	0.411	0.452	0.476	0.488

以所测得的吸光度为纵坐标, 以相应的 LDH 活力单位为横坐标, 绘制标准曲线:



注：上述标准曲线客户不用制作（LDH 纯酶标准品试剂盒里不提供），仅供参考，如需制作请自备该纯酶标准品。

附录 II：大鼠血浆 LDH 最佳取样量摸索

1、**样本来源**：正常组大鼠眼眶取全血，肝素抗凝后取血浆测定。

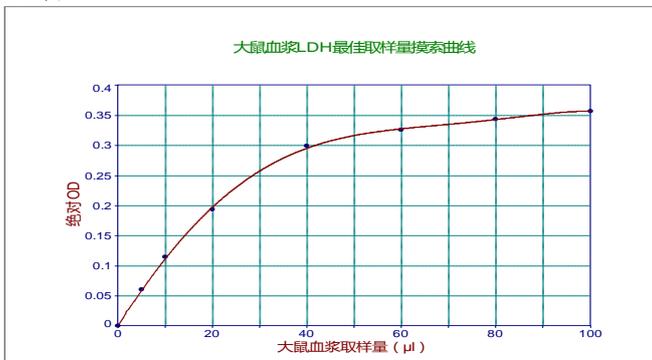
2、**操作表**：

	标准管	空白管	测定管	对照管
双蒸水 (mL)	0.13	0.15		0.05
2 μ mol/mL 标准品 (mL)	0.02			
不同浓度的样本 (mL)			0.10	0.10
基质缓冲液 (mL)	0.25	0.25	0.25	0.25
辅酶 I 溶液 (mL)			0.05	
混匀,37 $^{\circ}$ C水浴 15 分钟				
2,4—二硝基苯肼溶液 (mL)	0.25	0.25	0.25	0.25
混匀,37 $^{\circ}$ C水浴 15 分钟				
0.4mol/L 氢氧化钠溶液 (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5
混匀，室温放置 3 分钟，波长 440nm，光径 1cm，双蒸水调零，测定各管吸光度值				

3、**测定结果**：

管号	0	1	2	3	4	5	6	7
血浆 (mL)	0	0.005	0.010	0.020	0.040	0.060	0.080	0.100
生理盐水(mL)	0.1	0.095	0.090	0.080	0.060	0.040	0.020	0
测定管 OD	0.068	0.157	0.226	0.346	0.526	0.632	0.736	0.804
对照管 OD	0.068	0.096	0.111	0.152	0.227	0.306	0.392	0.447
绝对 OD	0	0.061	0.115	0.194	0.299	0.326	0.344	0.357

4、**大鼠血浆检测 LDH 时最佳取样量的摸索曲线（水浴温度为 37 $^{\circ}$ C）**：



（参考取样量：大鼠血浆为 10~30 μ L，最佳取样量为 20 μ L(实际操作时可固定取样量 100 μ L,将样本稀释成不同浓度做预试,选择测定-对照 OD 值差值在 0.2 左右的浓度进行正式实验)。在其范围内酶曲线通过回归曲线的处理，相对成正比关系。若取样量过大或过少，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：小鼠脑匀浆 LDH 最佳取样量摸索

1、**样本来源**：正常大鼠脑组织

2、**前处理**：正常组小鼠脑组织用生理盐水制成 10%的匀浆（详见公司官网“实验方法学”），2500 转/分离心 10 分钟，取上清 0.1mL 用生理盐水稀释至 5mL，即稀释成 0.2%的匀浆液待测。同时测得 2%的匀浆蛋白为 0.850mgprot/mL。（用考马斯亮兰法测定蛋白，本所有售）。

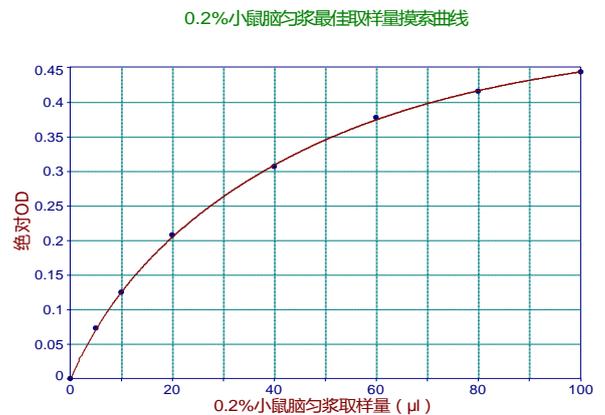
3、**操作表**：

	标准管	空白管	测定管	对照管
双蒸水 (mL)	0.13	0.15		0.05
2 μ mol/mL 标准品 (mL)	0.02			
不同浓度的样本 (mL)			0.10	0.10
基质缓冲液 (mL)	0.25	0.25	0.25	0.25
辅酶 I 溶液 (mL)			0.05	
混匀,37 $^{\circ}$ C水浴 15 分钟				
2,4—二硝基苯肼溶液 (mL)	0.25	0.25	0.25	0.25
混匀,37 $^{\circ}$ C水浴 15 分钟				
0.4mol/L 氢氧化钠溶液 (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5
混匀，室温放置 3 分钟，波长 440nm，光径 1cm，双蒸水调零，测定各管吸光度值				

4、**测定结果**：

管号	0	1	2	3	4	5	6	7
0.2%的匀浆液 (mL)	0	0.005	0.010	0.020	0.040	0.060	0.080	0.100
生理盐水(mL)	0.1	0.095	0.090	0.080	0.060	0.040	0.020	0
测定 OD	0.068	0.159	0.222	0.308	0.41	0.484	0.524	0.56
对照 OD	0.068	0.086	0.097	0.1	0.103	0.106	0.108	0.116
绝对 OD	0	0.073	0.125	0.208	0.307	0.378	0.416	0.444

5、**绘图如下**：



参考取样量：0.2%小鼠脑匀浆为 20~50 μ L，最佳取样量为 35~40 μ L(实际操作时可固定取样量 100 μ L,将样本稀释成不同浓度做预试,选择测定-对照 OD 值差值在 0.2 左右的浓度进行正式实验)。在其范围内酶曲线通过回归曲线的处理，相对成正比关系。若取样量过大或过少，则在实验结束后，在进行统计学处理时会出现无显著差异。