

乳酸脱氢酶检测试剂盒 (50T)

一般说明

乳酸脱氢酶 (LDH) 是一种可催化丙酮酸和乳酸相互转化的氧化还原酶。细胞在组织损伤或红细胞溶血后会将 LDH 释放到血流中。由于 LDH 是一种相当稳定的酶, 它已被广泛用于评估组织和细胞是否存在损伤和毒性。LDH 在某些特定的病理状态如癌症中会被提高。LDH 的定量具有一系列不同的应用。本检测是基于酶促反应中四唑盐 MTT 会被还原成还原型 MTT 所形成的紫色物质, 其吸光强度与酶活性成正比。检测范围: 2 -200U/L。

应用

适合用于检测生物学样本如血清、血浆、细胞、培养物和发酵培养基中的L(+)-乳酸。

试剂盒组成

缓冲液: 10 mL NAD溶液: 0.5 mL

MTT溶液: 0.75 mL PMS溶液: 0.75 mL

校准液: 2 mL

储存: 所有试剂均在-20°C下保存。

检测步骤

该项检测基于动力学反应, 为确保培养时间相同, 将反应液加至样品中时动作应迅速, 试剂的混和应快而彻底。建议使用多通道加样器。可在室温或30°C 下进行检测。

1、样品准备

血清和血浆样品可直接检测。

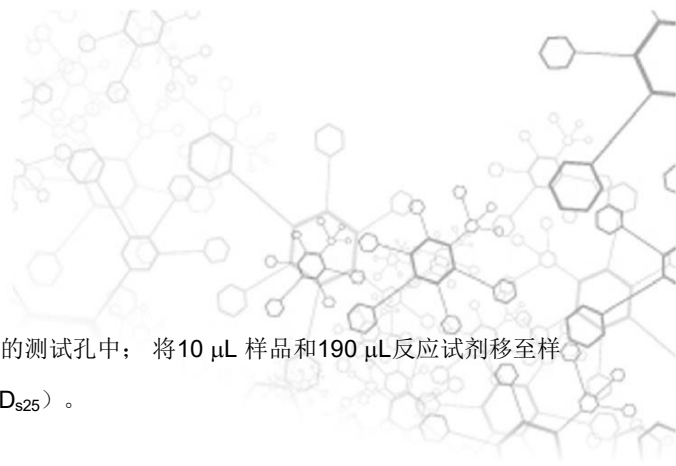
组织样品: 剥离前, 先用磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 洗去血液。每克组织用5mL 含100 mM 磷酸钾 (pH 7.0) 和2 mM EDTA 的缓冲液均浆。4°C下10,000g 离心15分钟。取上清液用于检测。

细胞提取物: 4°C下2,000g 离心5分钟以收集细胞。对于粘附细胞, 避免使用蛋白水解酶来采集细胞, 而应使用橡胶刮子。用适当体积的含100 mM磷酸钾 (pH 7.0) 和2 mM EDTA 的冷缓冲液均浆或超声降解细胞。4°C下10,000g 离心15分钟。取上清液用于检测。所有样品均可在-20 至 -80°C 下存放至少1个月。

2、反应试剂准备

将所有试剂放至室温。按如下比例为每个96孔板测试孔准备反应试剂: 将14 μ L MTT 溶液、8 μ L NAD溶液、8 μ L PMS溶液和170 μ L底物缓冲液混匀。建议现配现用。





RSTQM050

3、反应

将200 μL水（OD_{H2O}）和200 μL校准液（OD_{CAL}）分别移至透明平底96孔板的测试孔中；将10 μL样品和190 μL反应试剂移至样品孔中，轻轻振荡混匀。读取OD_{565nm}（OD_{S0}），25分钟后再读取一次（OD_{S25}）。

注：若样品中的LDH活性大于200 U/L，需用水稀释样本并重复检测。

浓度计算公式

$$\begin{aligned} \text{LDH} &= \frac{\text{OD}_{S25} - \text{OD}_{S0}}{\epsilon_{\text{mtt}} \cdot l} \times \frac{\text{ReactionVol}(\mu\text{L})}{\text{Time} \cdot \text{SampleVol}(\mu\text{L})} \times n \\ &= 43.68 \times \frac{\text{OD}_{S25} - \text{OD}_{S0}}{\text{OD}_{\text{CAL}} - \text{OD}_{\text{H2O}}} \times n \quad (\text{IU/L}) \end{aligned}$$

OD_{S25} 和 OD_{S0} 分别是 25 分钟和 0 分钟时读取的样品 OD_{565nm} 值。ε_{mtt} 是还原型 MTT 的摩尔吸光系数。l 是根据校准溶液计算得出的光程长度。OD_{CAL} 和 OD_{H2O} 分别是校准液和水的 OD_{565nm} 值。反应体积和样品体积分别是 200 μL 和 10 μL。n 是稀释系数。单位定义：1 个单位（U）的 LDH 在 pH 8.2 下每分钟可催化 1 μmole 乳酸盐转化成丙酮酸盐。

预防措施： 本产品仅供研究用，使用过程中应严格遵循实验安全措施。

