

## 人LDH-B双抗夹心ELISA检测试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号: KE00287  
规格: 96T  
灵敏度: 0.04 ng/mL  
检测范围: 0.625-40 ng/mL  
用途: 此试剂盒用于定量检测血清、血浆以及细胞裂解液中的人LDH-B浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

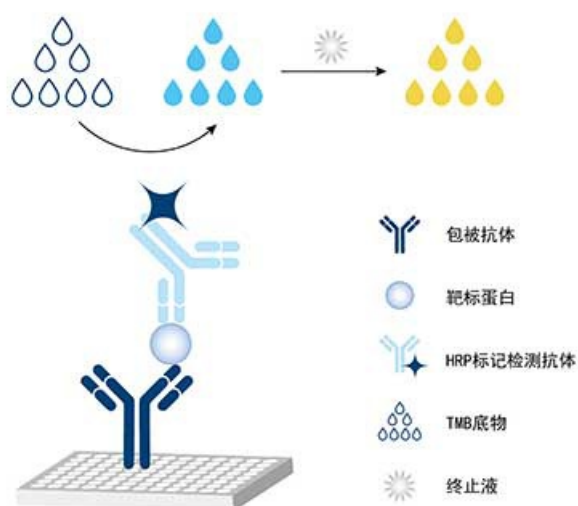
# 目录

|            |   |
|------------|---|
| 一：背景信息     | 3 |
| 二：检测原理     | 3 |
| 三：需自备的实验器材 | 3 |
| 四：试剂盒组分及储存 | 4 |
| 五：实验注意事项   | 4 |
| 六：样本准备     | 4 |
| 七：试剂准备     | 5 |
| 八：实验步骤     | 6 |
| 九：实验参数     | 7 |
| 9.1 参考标曲图  | 7 |
| 9.2 精密度    | 7 |
| 9.3 加标回收率  | 8 |
| 9.4 样本值    | 8 |
| 9.5 灵敏度    | 8 |
| 9.6 线性     | 9 |
| 9.7 特异性    | 9 |
| 十：参考文献     | 9 |

## 一：背景信息

LDH 是一种四聚体酶，由两种类型的四个亚基组成：肌肉/厌氧 (LDH-A) 和心脏/有氧 (LDH-B)。LDH-A亚基和LDH-B亚基 (由不同基因产生) 的各种组合可以形成同源或异源四聚体，并组装成五种不同的组合LDH-1 (4B)，LDH-2 (3B, 1A)，LDH-3 (2B, 2A)、LDH-4 (1B, 3A) 和LDH-5 (4A)。LDH-A将丙酮酸转化为乳酸并在骨骼肌中表达，而LDH-B将乳酸转化为丙酮酸并在心肌中表达更多。

## 二：检测原理



### ◀双抗夹心模式图 (检测抗体直标HRP)

按操作顺序形成抗体夹心结构后，加入TMB底物，板孔液体由无色变成蓝色，再加入终止液液体变为黄色后进行吸光度值测定。

## 三：需自备的实验器材

- 3.1 酶标仪 (可读取450 nm和630 nm双波长);
- 3.2 高精度移液器及一次性移液器枪头;
- 3.3 洗板机 (亦可手动洗板);
- 3.4 EP管 (用于稀释标准品及样本);
- 3.5 吸水毛巾或滤纸 (用于拍干);
- 3.6 烧杯和量筒;
- 3.7 用于ELISA实验的数据分析的统计拟合软件 (推荐四参数拟合方法)，如：Origin，ELISA Calc等。

## 四：试剂盒组分及储存

| 英文名称                                      | 中文名称                         | 规格       | 数量  |
|---|------------------------------|----------|-----|
| Microplate                                | 预包被酶标板 - 96孔板                | 8孔 × 12条 | 1 块 |
| Protein standard                          | 标准品 - 冻干粉状 *                 | 80 ng/瓶  | 2 瓶 |
| Detection antibody, HRP-conjugated (100×) | HRP标记检测抗体浓缩液 (100×) **       | 120 μL/支 | 1 支 |
| Additional Diluent AT-00287               | 干扰抑制剂 AT-00287 (仅用于人血清和血浆样本) | 6 mL/瓶   | 1 瓶 |
| Sample Diluent PT 4B1                     | 样本稀释液 PT 4B1                 | 30 mL/瓶  | 2 瓶 |
| Detection Diluent                         | 抗体稀释液                        | 30 mL/瓶  | 1 瓶 |
| Wash Buffer Concentrate (20×)             | 浓缩洗涤液 (20×)                  | 30 mL/瓶  | 1 瓶 |
| Extraction Reagent                        | 裂解液                          | 30 mL/瓶  | 1 瓶 |
| TMB                                       | 显色底物 TMB                     | 12 mL/瓶  | 1 瓶 |
| Stop Solution                             | 终止液                          | 12 mL/瓶  | 1 瓶 |
| Plate Cover Seals                         | 封板膜                          |          | 4 张 |

**储存条件：**  
1：未开启试剂盒可在2-8℃条件下存放6个月或者在-20℃条件下存放1年  
2：已开启试剂盒可在2-8℃存放7天  
3：每次实验均使用新的标准品,使用后丢弃

\* 使用对应的样本稀释液对标准品进行复溶，复溶过程避免产生气泡

\*\* 开盖前请离心

## 五：实验注意事项

- 5.1 避免皮肤接触终止液以及TMB 显色液；
- 5.2 在实验过程中，注意穿戴个人防护装备，如实验服，手套，口罩和护目镜；
- 5.3 请勿将不同批次的试剂进行混用，过期产品请勿使用；
- 5.4 在使用自动洗板机时，板孔加入洗涤液之后，设置30秒的浸泡程序，以提高分析的精确度。

## 六：样本准备

- 6.1 血清：全血标本室温凝固 30 min后1000×g 离心15 min，取上清立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融。
- 6.2 血浆：可用EDTA、肝素或柠檬酸盐作为抗凝剂，标本采集后1000×g 离心15 min，立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融（注意：标本溶血会影响检测结果，因此溶血标本不宜进行检测）。
- 6.3 细胞裂解液：收集细胞后，用预冷(2-8℃)的1×PBS洗3次，500×g离心5 min。细胞计数，离心弃上清；加PMSF至细胞裂解液中，终浓度为1 mM；按每 $1 \times 10^7$ 个细胞，加入1 mL细胞裂解液(含PMSF)，冰上裂解30 min，其间上下颠倒使裂解更充分，超声波破碎处理，8000×g-10000×g离心5 min，分离上清，分装后-80℃存放，并用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定总蛋白浓度，避免反复冻融。

## 七：试剂准备

### 7.1 洗涤液 (1×)：

如果洗涤液 (20×) 有晶体析出, 37°C加热至晶体全部溶解。按1:20稀释倍数进行稀释: 如取30 mL 浓缩洗涤液 (20×), 加入570 mL 超纯水或去离子水, 得到洗涤液 (1×)。

### 7.2 HRP标记检测抗体 (1×)：

开盖前瞬时离心, 按1:100比例进行稀释, 稀释前根据预先计算实验所需的总量配制 (100 μL/孔), 实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 μL HRP标记检测抗体浓缩液 (100×) 加 990μL 抗体稀释液进行配制, 轻轻混匀。

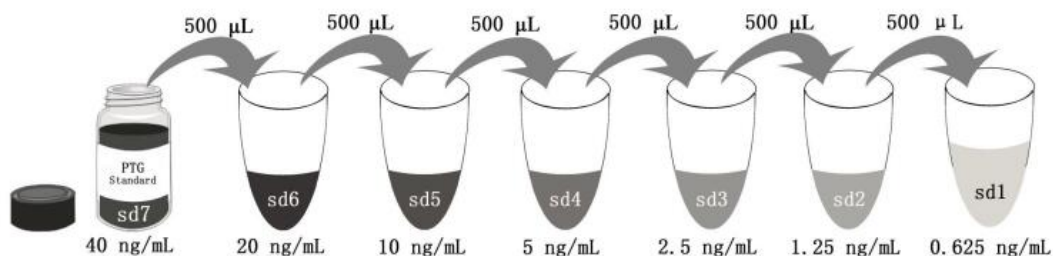
### 7.3 待检测样本：

不同的样本使用相应的样本稀释液进行稀释, 如果样本检测值超过标曲最高范围, 可将样本进行一定的稀释后再进行实验, 使样本的检测值处于标曲范围内, 不同样本的稀释倍数需自行优化。

稀释比推荐如下: 人血清和血浆样本1:4或1:8稀释; 细胞裂解液样本1:2至1:1000稀释; 样品采集、处理和储存的差异可能导致测值的改变。

### 7.4 梯度稀释的标准品：

用2 mL PT 4B1样本稀释液复溶标准品, 具体操作如下:



|   |         |        |        |        |        |        |        |
|---|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Add # μL of Standard diluted in the previous step | —       | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL |
| # μL of Sample Diluent PT 4B1                     | 2000 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL |
|   | "sd7"   | "sd6"  | "sd5"  | "sd4"  | "sd3"  | "sd2"  | "sd1"  |

## 八：实验步骤

实验前,需要将所需试剂在室温平衡20-30 min(HRP标记 检测抗体浓缩液不需要平衡室温,即用即取);在进行标准品、样本以及不同试剂加样时,更换枪头,避免接触微孔板的内表面,不同的试剂,使用不同的加样槽;

8.1 根据实验用量,取出需要用到的酶标板条,剩余板条加入干燥剂放入铝箔袋密封后存放于4°C,并于一周之内用完;

8.2 分别设零孔、标准品孔、待测样本孔:

对于人血清和血浆样本,零孔、标准品孔以及待测样本孔预先加入50  $\mu$ L/孔干扰抑制剂溶液,不需要孵育和洗涤;

对于细胞裂解液样本,不需要加入干扰抑制剂,可直接进行下一步;

8.3 加样,零孔中加样本稀释液100  $\mu$ L,余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100  $\mu$ L/孔;注意不要产生气泡(建议标准品和样本都做复孔,尽量避免实验误差,确保上样不间断,5-10 min完成加样);

8.4 酶标板盖上覆膜,37°C孵育2 h;

8.5 洗涤

1) 揭开封板膜(动作轻柔,避免动作过大导致液体溢出串孔),弃液体,拍干;

2) 洗涤液(1 $\times$ )洗涤板条,每孔350-400  $\mu$ L,洗涤后,甩掉液体拍干板条,重复此步骤4次,避免异物进入板孔以及板条干燥;

8.6 每孔加100  $\mu$ L HRP标记检测抗体(1 $\times$ )(参照试剂准备部分7.2),盖上封板膜,37°C孵育60 min;

8.7 重复步骤8.5;

8.8 显色:每孔加TMB显色液100  $\mu$ L,37°C避光显色 15-20 min(如果颜色偏浅,可适当延长显色时间,不超过30 min;保持显色底物始终处于避光状态,显色底物在加样前应是无色透明,如有变色,请勿使用);

8.9 终止:每孔加终止液100  $\mu$ L,蓝色变黄色。终止液与TMB显色液的加样顺序一致;(注意:眼睛和皮肤避免接触终止液);

8.10 读数:以630 nm为校正波长,用酶标仪在450 nm波长测量各孔的光密度(OD值)。加入终止液后5 min内进行读数,若无630 nm 波长,也可直接使用450 nm 波长读数;

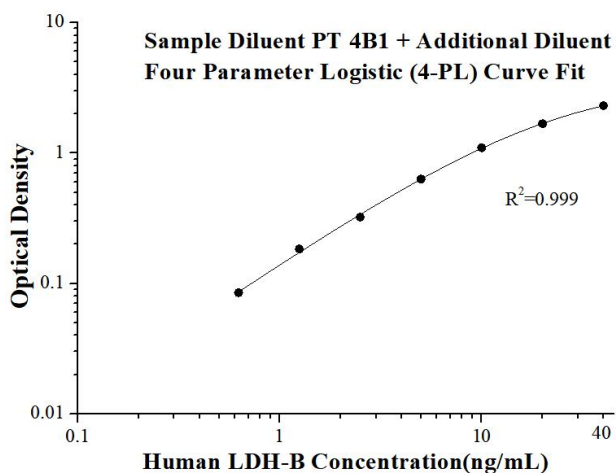
8.11 数据分析:每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值,设置复孔,取其平均值。以标准品的浓度为横坐标,OD 值为纵坐标,使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL),根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度,乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下:

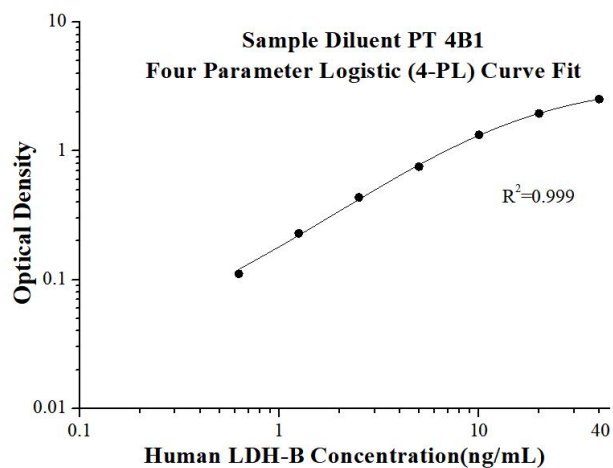
| 步骤 | 试剂   | 体积          | 孵育时间     | 洗涤次数  | 孵育温度         |
|----|--|-------------|----------|-------|--------------|
| 1  | 干扰抑制剂(仅针对人血清和血浆样本)                           | 50 $\mu$ L  | 0 分钟     | 不需要洗涤 | -            |
| 2  | 标准品或样本                                       | 100 $\mu$ L | 120 分钟   | 4 次   | 覆膜后37°C孵育    |
| 3  | HRP标记检测抗体(1 $\times$ )                       | 100 $\mu$ L | 60 分钟    | 4 次   | 覆膜后37°C孵育    |
| 4  | 显色 TMB                                       | 100 $\mu$ L | 15-20 分钟 | 不需要洗涤 | 覆膜后37°C孵育,避光 |
| 5  | 终止液  | 100 $\mu$ L | 0 分钟     | 不需要洗涤 | -            |
| 6  | 加入终止液后以630 nm为校正波长,在450 nm处测量OD值,此过程建议不超过5分钟 |             |          |       |              |

## 九：实验参数

### 9.1 参考标曲图



| (ng/mL) | O.D            | Average | Corrected |
|---------|----------------|---------|-----------|
| 0       | 0.077<br>0.072 | 0.074   | -         |
| 0.625   | 0.160<br>0.159 | 0.160   | 0.085     |
| 1.25    | 0.257<br>0.261 | 0.259   | 0.184     |
| 2.5     | 0.383<br>0.413 | 0.398   | 0.323     |
| 5       | 0.674<br>0.736 | 0.705   | 0.631     |
| 10      | 1.144<br>1.200 | 1.172   | 1.098     |
| 20      | 1.681<br>1.821 | 1.751   | 1.677     |
| 40      | 2.393<br>2.370 | 2.382   | 2.307     |



| (ng/mL) | O.D            | Average | Corrected |
|---------|----------------|---------|-----------|
| 0       | 0.076<br>0.077 | 0.076   | -         |
| 0.625   | 0.191<br>0.183 | 0.187   | 0.111     |
| 1.25    | 0.302<br>0.309 | 0.305   | 0.229     |
| 2.5     | 0.520<br>0.503 | 0.511   | 0.435     |
| 5       | 0.819<br>0.844 | 0.831   | 0.755     |
| 10      | 1.411<br>1.408 | 1.410   | 1.333     |
| 20      | 2.018<br>2.043 | 2.030   | 1.954     |
| 40      | 2.642<br>2.556 | 2.599   | 2.522     |

### 9.2 精密度

板内精密度：3个不同浓度的样本在板内重复测定 20次；

板间精密度：3个不同浓度的样本在板间重复测定 24次。

| 板内精密度 (CV内) |    |             |      |         |
|-------------|----|-------------|------|---------|
| 样本          | 数量 | 平均值 (ng/mL) | 标准差  | 变异系数CV% |
| 1           | 20 | 18.65       | 0.72 | 3.84    |
| 2           | 20 | 4.56        | 0.20 | 4.47    |
| 3           | 20 | 0.99        | 0.08 | 8.25    |

| 板间精密度 (CV间) |    |             |      |         |
|-------------|----|-------------|------|---------|
| 样本          | 数量 | 平均值 (ng/mL) | 标准差  | 变异系数CV% |
| 1           | 24 | 17.81       | 0.79 | 4.46    |
| 2           | 24 | 4.49        | 0.14 | 3.16    |
| 3           | 24 | 1.13        | 0.09 | 8.15    |

### 9.3 加标回收率

样本稀释后，在标曲范围内选择高、中、低3个浓度，进行人LDH-B的加标回收率实验，结果如下：

| 样本类型  | 稀释倍数 | 均值 (%) | 范围 (%)  |
|-------|------|--------|---------|
| 人血清   | 1:2  | 114    | 86-130  |
|       | 1:4  | 113    | 103-130 |
| 细胞裂解液 | 1:4  | 102    | 92-117  |
|       | 1:8  | 103    | 92-122  |

### 9.4 样本值

人血清 - 应用本试剂盒，检测人血清样本中人LDH-B的浓度：

| 样本类型       | 均值 (ng/mL) | 范围 (ng/mL) |
|------------|------------|------------|
| 人血清 (n=16) | 24.1       | 9.4-47.3   |

#### 细胞裂解液

|         | LDH-B (ng/mL) | Total protein (mg/mL) |
|---------|---------------|-----------------------|
| Hela    | 11920.0       | 4.4                   |
| HepG2   | 20.0          | 6.7                   |
| HEK-293 | 7360.0        | 5.1                   |
| MCF-7   | 720.0         | 4.7                   |

### 9.5 灵敏度

用20个重复的零孔平均OD值加上两倍标准差得到的OD值带入标准曲线拟合出对应的浓度值，此试剂盒中人LDH-B的灵敏度为0.04 ng/mL。



## 9.6 线性

用对应样本稀释液稀释样本，使稀释后的检测值处于标曲范围内，线性数据如下：

|      |        | 人血清     | 细胞裂解液  |
|------|--------|---------|--------|
| 1:2  | 均值 (%) | 100     | 100    |
|      | 范围 (%) | -       | -      |
| 1:4  | 均值 (%) | 100     | 98     |
|      | 范围 (%) | 76-115  | 92-102 |
| 1:8  | 均值 (%) | 102     | 91     |
|      | 范围 (%) | 88-117  | 79-103 |
| 1:16 | 均值 (%) | 112     | 97     |
|      | 范围 (%) | 103-121 | 88-107 |

## 9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人LDH-B

加入50 ng/mL以下细胞因子，有交叉反应

Human:

LDHA 交叉反应约为1.4%

## 十：参考文献

- 1、Wu J, Liu L, Hu H, Gao Z, Lu S. Bioinformatic analysis and experimental identification of blood biomarkers for chronic nonunion. *J Orthop Surg Res.* 2020;15(1):208. Published 2020 Jun 5. doi:10.1186/s13018-020-01735-1
- 2、Li H, Li J, Wang Y, Yang T. Proteomic analysis of effluents from perfused human heart for transplantation: identification of potential biomarkers for ischemic heart damage. *Proteome Sci.* 2012;10(1):21. Published 2012 Mar 23. doi:10.1186/1477-5956-10-21
- 3、Duka T, Collins Z, Anderson SM, et al. Divergent lactate dehydrogenase isoenzyme profile in cellular compartments of primate forebrain structures. *Mol Cell Neurosci.* 2017;82:137-142. doi:10.1016/j.mcn.2017.04.007