

乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性检测试剂盒说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

产品简介:

乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH 或 LD), 是一种稳定的蛋白质, 存在于正常细胞的胞质中, 正常情况下不能透过细胞膜; 当细胞受损伤时, 膜通透性增强, LDH 即被释放到胞外。细胞质内 LDH 减少, 培养液中 LDH 增多, 测定培养液中 LDH 活性或 LDH 漏出率即可反映药物的细胞毒性。

LDH 属于氧化还原酶, 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: 乳酸+NAD⁺→丙酮酸+NADH+H⁺。其中: L→P 为正向反应; P→L 为逆向反应。

乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性检测试剂盒其检测原理是以 NAD 为受氢体, LDH 催化乳酸脱氢生成丙酮酸, 丙酮酸再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, 可用酶标仪检测 440nm 处的吸光度, 通过公式可以计算出细胞毒性时释放的 LDH 活性或检测其他样品中的 LDH 活性。本试剂盒可用于常规的 LDH 活性的检测, 更常用于以 LDH 释放为指标的细胞毒性的检测。该试剂盒仅用于科研领域。

产品组成:

产品名称	规格	保存条件	说明书	有效期
乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性检测试剂盒	100T/500T	RT	1 份	6 个月
试剂(A): LDH Assay buffer	3ml/15ml	4℃ 避光	1 份	6 个月
试剂(B): NAD 溶液	0.6ml/3ml	-20℃	1 份	6 个月
试剂(C): 苯胍显色液	3ml/15ml	4℃ 避光	1 份	6 个月
试剂(D): 碱性显色液	10ml/50ml	RT	1 份	6 个月
试剂(E): LDH 释放剂(10×)	2ml/10ml	RT	1 份	6 个月

自备材料:

1、96 孔板培养的待测组细和对照组细胞样品

- 2、无菌 PBS、培养液、蒸馏水
- 3、多孔板离心机、96 孔板或离心机、离心管
- 4、恒温箱或水浴锅
- 5、酶标仪

操作步骤(仅供参考):

1、准备样品:

①LDH 释放检测: 根据细胞的大小和生长速度将适量细胞接种到 96 培养板中, 使待检测时细胞密度不超过 90%满。吸去培养液, PBS 清洗一次, 加新培养液, 并根据实验需要设置相应的背景空白对照孔 A、样品对照孔 B、最大酶活对照孔 C、药物处理样品孔 D 等分组, 继续培养。待检测前取出细胞培养板, 在”最大酶活对照孔 C”加入 LDH 释放剂(10 ×), 加入量为原有培养液体积的 10%, 并反复吹打混匀数次, 然后继续培养 1H 左右。将细胞培养板用多孔板离心机 400g 离心 5min, 分别抽取各孔上清液 30~50 μl, 加入到一个新的 96 孔板相应孔中, 用于后续的 LDH 检测。

②细胞内总 LDH 的细胞毒性和细胞增殖检测: 根据细胞的大小和生长速度将适量细胞接种到 96 培养板中, 使待检测时细胞密度不超过 90%满。加入不同药物处理, 并设置适当对照。将细胞培养板用多孔板离心机 400g 离心 5min, 吸除培养液, 加入 150 μl 用 PBS 10 倍稀释的 LDH 释放剂, 晃动培养板使充分混匀, 然后继续培养 1H 左右。将细胞培养板用多孔板离心机 400g 离心 5min, 分别抽取各孔上清液 30~50 μl, 加入到一个新的 96 孔板相应孔中, 用于后续的细胞毒性检测。

③样品准备完毕后可以用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度, 以便于后续计算单位蛋白重量组织或细胞内的 LDH 含量。

2、LDH 酶促: 按照下表顺序依次加入各溶液, 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(μl)	加入量(μl)
待测样品(上清液)	10
LDH Assay buffer	25
NAD Buffer	5
混匀, 37℃孵育 15min。	
苯肼显色液	25
混匀, 37℃孵育 15min。	
碱性显色液	100
蒸馏水	150

3、LDH 测定: 混匀, 室温放置 5min, 酶标仪 440nm 处测定各孔吸光度。

计算:

细胞毒性或死亡率= $(AD-AB)/(AC-AB) \times 100\%$

如同时检测一已知浓度 c 的 LDH 酶标准品对应吸光度值 AY 和标准空白对照吸光度值 AY_0 , 则可粗略计算出样品中的酶活力:

待测样品中 LDH 活力单位 (mU/ml) = $(AB-AA)/(AY-AY_0) \times c$

如需准确计算样品 LDH 酶的绝对活性, 可用自备的 LDH 标准品及测得的相应吸光度值绘制标准曲线, 通过标准曲线相应公式可计算出样品的酶活性。

其中: AA =背景空白对照孔 A 的吸光度

AB =样品对照孔 B 的吸光度

AC =最大酶活对照孔 C 的吸光度

AD =药物处理样品孔 D 的吸光度

结果与分析:

通过直接比较每孔 LDH 的活性判定药物或毒物的细胞毒性。LDH 的活性越高, 表示细胞膜通透性越高, 细胞受损越严重。

注意事项:

- 1、培养细胞时要用无血清或低浓度血清的培养液, 以排除血清的干扰, 否则会有偏差。
- 2、EDTA 对 LDH 有抑制作用, 操作中避免使用或尽量彻底清除含 EDTA 的试剂。
- 3、LDH 尽可能现取现测, 如收集的细胞培养液放置时间较长, 可能使 LDH 的活性降低。
- 4、同一批试验尽量用同一次配置的溶液, 溶液的使用量应统一, 反应时间也应一致。
- 5、酶促反应中, 上清液取样量以 5~20ul 为宜, 。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。
- 6、显色后应在 15min 内测定完成。
- 7、碱性显色液有一定腐蚀性, 请小心操作。

相关产品:

PIPES 缓冲液 (10mmol/L, pH6.8)
乳酸脱氢酶 (LDH) 细胞毒性检测试剂盒
台盼蓝染色细胞存活率检测试剂盒
新建文本文档.bat
线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1 法)
罗丹明 123 溶液 (0.5mg/ml)