

乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性检测试剂盒

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, 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, 不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成

名称	编号	ADS008CT0	ADS008CT1	Storage
		100T	500T	
试剂(A): LDH Assay Buffer		3ml	15ml	4°C 避光
试剂(B): NAD 溶液		0.6ml	3ml	-20°C
试剂(C): 苯胍显色液		3ml	15ml	4°C 避光
试剂(D): 碱性显色液		10ml	50ml	RT
试剂(E): LDH 释放剂(10×)		2ml	10ml	RT
使用说明书		1 份		

自备材料

- 1、96 孔板培养的待测组和对照组细胞样品、无菌 PBS、培养液、蒸馏水
- 2、多孔板离心机、96 孔板或离心机、离心管、恒温箱或水浴锅、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(无细胞的培养液)、样品对照孔 B(未经药物处理的对照细胞)、最大酶活对照孔 C(未经药物处理的细胞后经裂解的样品)、药物处理样品孔 D(经药物处理的细胞)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 5μl,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 150μl 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 5μl,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)	5
LDH Assay Buffer	25
NAD Buffer	5
混匀, 37°C 孵育 15min。	
苯肼显色液	25
混匀, 37°C 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

$$\text{细胞毒性或死亡率} = (A_D - A_B) / (A_C - A_B) \times 100\%$$

如同时检测一已知浓度 c 的 LDH 酶标准品对应吸光度值 A_Y 和标准空白对照吸光度值 A_{Y0} , 则可粗略计算出样品中的酶活力:

$$\text{待测样品中 LDH 活力单位 (mU/ml)} = (A_B - A_A) / (A_Y - A_{Y0}) \times c$$

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： A_A =背景空白对照孔 A 的吸光度
 A_B =样品对照孔 B 的吸光度
 A_C =最大酶活对照孔 C 的吸光度
 A_D =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 2.5~10ul 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。
- 8、试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。
- 9、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期：12个月；低温运输，按要求保存。