

乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性检测试剂盒

货号: L0118

存储条件: 4°C, 收到货后按照要求保存部分, 有效期 1 年。

产品组分

组分	名称	100T	500T	储存条件
L0118-A	LDH Assay Buffer	3ml	15ml	4°C避光
L0118-B	NAD Buffer	0.6ml	3ml	-20°C
L0118-C	苯肼显色液	3ml	15ml	4°C避光
L0118-D	碱性显色液	10ml	50ml	常温
L0118-E	LDH 释放剂 (10x)	2ml	10ml	常温

产品说明

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肼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。本试剂盒仅用于科研领域, 不适用于临床诊断或其他用途。

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(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(10x), 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

添加物	加入量 (ul)
待测样品 (上清液)	5
LDH Assay Buffer	25
NAD Buffer	5
混匀后 37°C 孵育 15min	
苯肼显色液	25
混匀后 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。

4、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_V 和标准空白对照吸光度值 A_{V0} ，则可粗略计算出样品中的酶活力：

$$\text{待测样品中 LDH 活力单位(mU/ml)} = (A_B - A_A) / (A_V - A_{V0}) \times C$$

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。

