



乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性检测试剂盒

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。该试剂盒仅用于科研领域,不适用于临床诊断或其他用途。

组成:

名称	编号	R24020	R24020	Storage
		100T	500T	
试剂(A): LDH Assay Buffer		3ml	15ml	4℃ 避光
试剂(B): NAD粉剂		1支	2支	-20℃
试剂(C): 苯肼显色液		3ml	15ml	4℃ 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 $\times$), 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5 μ l, 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 μ l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5 μ l, 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、配制NAD溶液: 取1支 NAD(粉末), 溶解于1.5ml去离子水, 即成。

3、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(μ l)	加入量(μ l)
待测样品(上清液)	5
LDH Assay Buffer	25
NAD 溶液	5
混匀, 37 $^{\circ}$ C孵育15min。	
苯肼显色液	25
混匀, 37 $^{\circ}$ C孵育15min。	



碱性显色液	100
蒸馏水	150

4、LDH测定：混匀，室温放置5min，酶标仪440nm处测定各孔吸光度。

计算：

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

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AY0，则可粗略计算出样品中的酶活力：

$$\text{待测样品中LDH活力单位 (mU/ml)} = (AB - AA) / (AY - AY0) \times c$$

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。



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

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。

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个月有效；低温运输，-20℃保存。



源叶