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， LRH 或 R) 是种稳定的蛋白质，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， RH 即被释放到胞外 ; 细胞质内 LRH 减少，培养液中 LDH 增多，测定培养液中 LRH 活性或 LRH 漏出率即可反映药物的细胞毒性。属于氧化还原酶， 能可逆的催化乳酸 (4) 和丙酮酸 (P) 之间的氧化还原反应。其反应公式 : 乳酸 +NADt - + 丙酮酸 +NADH+H, 其中 : L→P 为征向反应 ; P- →L 为逆向反应。

乳酸脱氢酶 (RH) 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 _ 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。

产品组成:

编号 / 名称	GCCT0027 100T	GCCT0027 500T	Storage
试剂 (A): LDH Assay Buffer	3ml	15ml	4℃ 避光
试剂 (B): NAD	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×)，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、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 (μl)	加入量 (μl)
待测样品 (上清液)	5
LDH Assay Buffer	25
NAD 溶液	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

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:

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：

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 个月有效；低温运输，按要求保存。

相关产品：

产品编号	产品名称
GCCA0005	氨苄青霉素溶液 (Ampicillin,50mg/ml)
GCCT0026	MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒
GCDH0006	苏木素伊红 (HE) 染色液 (醇溶)
GCDP0013	GUS 染色液 (即用型)
GCPT0001	BCA 蛋白定量试剂盒
GCTC0699	植物总糖和还原糖检测试剂盒 (DNS 比色法)
GCTC0713	葡萄糖检测试剂盒 (GOD-POD 比色法)
GCTE0158	乳酸脱氢酶 (LDH) 检测试剂盒 (二硝基苯肼微板法)