



乳酸脱氢酶 (LDH) 细胞毒性检测试剂盒

目录号 : ABC1628

产品简介

乳酸脱氢酶 (LDH) 是糖酵解途径的末端酶, 广泛存在于动物、植物、微生物中, 参与催化丙酮酸和乳酸之间的可逆反应。通常LDH在细胞胞浆内含量丰富, 正常细胞由于细胞膜的屏障保护作用, 胞内LDH不能随意通过细胞膜。但当细胞受到损伤或者死亡时, 细胞膜的屏障保护作用消失, 细胞内的LDH被释放到培养液中。通过检测细胞膜破裂释放到培养液中的LDH含量, 即可对细胞毒性进行定量分析。

乳酸脱氢酶 (LDH) 细胞毒性检测试剂盒主要原理是利用LDH将NAD⁺被还原成NADH, 进一步NADH和INT (四唑盐) 在Diaphorase (硫辛酰胺脱氢酶) 催化下, 生成NAD⁺和红色甲臅, 甲臅产生的量和LDH的含量成线性正相关, 且能够在490 nm波长下产生吸收峰, 因此可以通过仪器进行定量分析。本试剂盒主要用于以LDH释放为指标的细胞毒性检测, 同时也可用于以细胞总LDH为基础的细胞增殖和毒性检测。

储存与运输

冰袋(wet ice)运输; -20°C保存, INT溶液需避光保存, 酶溶液避免反复冻融; 12个月有效。

操作步骤

1. 样品前准备:

1) LDH释放检测样品准备:

a. 细胞接种: 将细胞以合适的密度接种于96孔细胞培养板中, 可根据实验需求设置多个分组, 例如: 背景空白对照孔 (仅含细胞培养基)、样品对照孔 (未经处理的细胞孔)、样品最大酶活性对照孔 (未处理孔, 细胞裂解后测胞内总LDH量)、处理样品孔 (实验组) 等;

b. 细胞处理: 根据实验设计, 除去原有培养基, 使用PBS缓冲液 (推荐ABC4220) 洗涤一次, 根据分组换上对应的含药物或者不含药物的无血清或低血清培养基, 并孵育一定时间;

c. 样本收集: 将细胞培养板1000 g离心5 min, 取80 μL培养上清液, 加到新的96孔板中, 随后对样品进行测定 (样品最大酶活性对照孔的样品准备工作, 请参考细胞内总LDH检测样品准备步骤)。

2) 细胞内总LDH检测样品准备:

a. 细胞接种: 将细胞以合适的密度接种于96孔细胞培养板中, 可根据实验需求设置多个分组;

b. 细胞处理: 根据实验设计, 使用含药物或者不含药物的培养基 (可含血清) 孵育细胞;

c. 细胞裂解: 达到预定时间后, 去除原培养基, 用PBS洗涤一遍, 加入120 μL细胞裂解工作液 (10×细胞裂解液使用PBS稀释10倍), 并于培养箱中孵育30-60 min;

d. 样本收集: 将细胞培养板1000 g离心5 min, 取80 μL裂解上清液加到新的96孔板中, 随后进行测定。

3) (选做) LDH标准样品准备:

如需对LDH酶活性的进行绝对定量, 请自行购买和配制不同浓度LDH标准品, 浓度可设置为10 mU/mL、5 mU/mL、2.5 mU/mL、1.25 mU/mL、0.65 mU/mL、0 mU/mL。以每孔80 μL, 梯度加至96孔板中。



乳酸脱氢酶 (LDH) 细胞毒性检测试剂盒 目录号 : ABC1628

2. LDH检测 :

1) 根据待测样品数量, 参考下表配制适量的LDH检测工作液 (主要对应96孔板检测, 其他规格的孔板, 可视情况进行调整) ;

1个样品 10个样品 20个样品 50个样品

反应底物	20 μ L	200 μ L	400 μ L	1 mL
INT溶液	2 μ L	20 μ L	40 μ L	100 μ L
酶溶液	3 μ L	30 μ L	60 μ L	150 μ L
反应缓冲液	55 μ L	550 μ L	1.1 mL	2.75 mL
总体积	80 μ L	800 μ L	1.6 mL	4 mL

2) 将LDH检测工作液, 加入到待检测样品孔中, 每孔80 μ L (样本与LDH检测工作液体积比为1:1), 轻敲混均 ;

3) 将其放入细胞培养箱中, 避光孵育30 min, 也可用锡箔纸包裹, 室温于水平摇床上孵育30 min ;

4) 使用酶标仪, 在490 nm处测定吸光度。可使用600 nm或大于600 nm的任一波长作为参考波长进行双波长测定。

3. LDH结果计算 :

1) 常规LDH (释放) 细胞毒性检测 :

a. 将样品对照孔、样品最大酶活性对照孔、处理样品孔等OD490减去背景空白对照孔OD490, 并用于后续的计算 ;

b. 细胞毒性或死亡率计算 (%) = (处理样品孔OD490 - 样品对照孔OD490) / (样品最大酶活性对照孔OD490 - 样品对照孔OD490) \times 100%

2) LDH酶活性的相对定量 (根据计算结果可以比较不同样品处理组间有无统计学差异等) :

a. 测定一个已知浓度的LDH标准品OD490 ;

b. 待测样品LDH活性 (mU/mL) = (样品孔OD490 - 背景空白对照孔OD490) / (标准品OD490 - 背景空白对照孔OD490) \times 标准品浓度 (mU/mL)

3) LDH酶活性的绝对定量:

a. 测定一系列LDH梯度标准品OD490, 根据所得的吸光值绘制标准曲线, 并计算出趋势公式: Y (OD490) = $A \times$ LDH活力单位 (mU) + B , 可通过Excel等软件计算出趋势线的斜率和截距 ;

b. 检测体系中LDH活性 (mU) = (样品孔OD490 - 背景空白对照孔OD490 - B) / A

c. 样品LDH活性 (mU/mL) = 检测体系中LDH活性 (mU) / 检测体积 (mL)

注意事项

1. 细胞检测时, 密度不要超过85%, 细胞的状态和密度等因素都会对细胞LDH释放造成一定的影响, 且样品准备好后, 尽量当天完成检测, 不要冷冻 ;

乳酸脱氢酶 (LDH) 细胞毒性检测试剂盒

目录号 : ABC1628

2. 血清中含有乳酸脱氢酶, 建议使用无血清或者低血清培养基; 如必须使用10%血清, 需设置无细胞对照组, 以消除背景干扰;
3. 操作时尽量温和, 避免产生气泡, 以免对实验结果产生影响;
4. 为了您的健康和安​​全, 操作时请穿好实验服、戴好手套。

本产品仅供科研用途, 不用于临床诊断!

(产品包装升级中, 以实物为准。)

