货号：ZC-A4127 规格：100T

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。本试剂盒可用于常规的 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。

产品组成：

编号 / 名称	ZC-A4127 100T	Storage
试剂(A): LDH Assay buffer	3ml	4℃ 避光
试剂(B): NAD 溶液	0.6ml	-20℃
试剂(C): 苯肼显色液	3ml	4℃ 避光
试剂(D): 碱性显色液	10ml	RT
试剂(E): LDH 释放剂(10×)	2ml	RT
使用说明书	1 份	

自备材料：

1、 96 孔板培养的待测组细和对照组细胞样品
2、 无菌 PBS、培养液、蒸馏水
3、 多孔板离心机、96 孔板或离心机、离心管
4、 恒温箱或水浴锅
5、 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、样品对照孔 B、最大酶活对照孔 C、药物处理样品孔 D 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 30~50μl，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 30~50μl，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)	10
LDH Assay buffer	25
NAD Buffer	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

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：

细胞毒性或死亡率=$(A_D-A_B)/(A_C-A_B)\times100\%$

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 5~20ul 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。

有效期：6 个月有效。低温运输，NAD 溶液 -20℃保存。