**乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性检测试剂盒说明书**

**产品编号：**RC24020

**产品简介：**

乳酸脱氢酶(lactate dehydro ge nase，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 440n m 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 | RC22165  500T | Storage |
| 试剂(A): LDH Assay buffer | 3 ml | 4℃ 避光 |
| 试剂(B): NAD 溶液 | 0.6 ml | -20℃ |
| 试剂(C): 苯肼显色液 | 3 ml | 4℃ 避光 |
| 试剂(D): 碱性显色液 | 10 ml | R T |
| 试剂(E): LDH 释放剂(10×) | 2 ml | R T |
| 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

1. 多孔板离心机、96 孔板或离心机、离心管
2. 恒温箱或水浴锅
3. 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 400 g 离心 5 min，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 400 g 离心 5 min，分别抽取各孔上清液 30 ~ 5 0μl，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 15 min。 | |
| 苯肼显色液 | 25 |
| 混匀，37℃孵育 15 min。 | |
| 碱性显色液 | 100 |
| 蒸馏水 | 150 |

3、LDH 测定：混匀，室温放置 5 min，酶标仪 440n m 处测定各孔吸光度。

**计算：**

细胞毒性或死亡率=(A D-A B)/(AC-AB)×100 %

如同时检测一已知浓度c的L D H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：

待测样品中 LDH 活力单位（ m U/ ml）=(AB-A A)/(AY-AY 0)×c

如需准确计算样品 LD H 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

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 ~20 ul 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 15 min 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。