

乳酸脱氢酶释放检测试剂盒(WST-8法)

产品编号	产品名称	包装
C0019S	乳酸脱氢酶释放检测试剂盒(WST-8法)	100次
C0019M	乳酸脱氢酶释放检测试剂盒(WST-8法)	500次

产品简介:

- 碧云天的乳酸脱氢酶释放检测试剂盒(WST-8法) (LDH Release Assay Kit with WST-8), 也称乳酸脱氢酶检测试剂盒(WST-8法) (LDH Assay Kit with WST-8)、乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(WST-8法) (LDH Cytotoxicity Assay Kit with WST-8)或乳酸脱氢酶活性检测试剂盒(WST-8法) (LDH Activity Assay Kit with WST-8), 是一种基于WST-8的显色反应, 通过比色法快速、高灵敏地检测细胞坏死(Necrosis)等细胞膜完整性受损时释放的乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)活性或检测其它样品中的LDH活性的试剂盒。
- 本试剂盒用于以LDH释放为指标的细胞毒性检测, 也可以用于常规的乳酸脱氢酶活性的检测。
- LDH是绝大部分哺乳动物活细胞中都存在的酶, 广泛存在于哺乳动物各个组织中, 以心、骨骼肌和肾脏通常最为丰富, 是临床心肌酶谱检查中的一项重要指标, 可用于心肌疾病的辅助诊断。LDH催化乳酸(Lactate)生成丙酮酸(Pyruvate), 同时伴随着NAD⁺到NADH的转化。由于其常在组织损伤期间释放(通常因为细胞膜失去完整性而导致细胞内LDH的释放), 因此也被视作细胞坏死和常见损伤和相关疾病的生物标志物[1, 2]。
- 细胞死亡包括凋亡(Apoptosis)、坏死(Necrosis)、焦亡(Pyroptosis)等多种形式。其中受调控的细胞死亡被称为程序性细胞死亡(Programmed cell death, PCD), 而不受调控的细胞死亡被称为坏死。细胞坏死(Necrosis)或者细胞凋亡(Apoptosis)的继发性坏死(Secondary necrosis)、焦亡(Pyroptosis)等造成的细胞膜结构的破坏会导致细胞内的酶释放至细胞外, 其中包括酶活性较为稳定的LDH。如果是培养的细胞就会释放到培养液里; 如果是活体动物就会释放到组织微环境并很可能进入血液。对于培养的细胞, 通过检测从质膜破裂的细胞中释放出来的LDH的活性, 就可以实现对细胞毒性的定量分析。LDH释放被认为是细胞膜完整性的重要指标, 并被广泛用于细胞坏死等细胞膜完整性受损的检测。LDH释放被认为是以前使用放射性的⁵¹Cr标记细胞, 随后通过⁵¹Cr释放进行细胞膜完整性检测的安全有效的替代方法[3]。
- LDH活性有多种比色测定方法如DNP法、INT法、WST-8法等。DNP法即2,4-二硝基苯肼法, 其原理是LDH催化乳酸生成丙酮酸, 丙酮酸和2,4-二硝基苯肼(2,4-dinitrophenylhydrazine)反应, 生成二硝基苯腙(2,4-dinitrophenylhydrazone), 在碱性溶液中呈棕红色, 其颜色深浅与LDH量成正比。DNP法步骤较为繁琐, 一般较为少用。INT法, 如碧云天乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(C0016/C0017), 是基于在LDH的作用下, NAD⁺被还原生成NADH, NADH和INT (2-*p*-iodophenyl-3-nitrophenyl tetrazolium chloride)被硫辛酰胺脱氢酶(Diaphorase)催化反应生成NAD⁺和强生色物甲臞(Formazan)。
- 本试剂盒采用的是WST-8法, 和INT法相比, 通常检测灵敏度更高, 吸光度变化更大, 检测结果更准确。
- 本试剂盒既可以检测D-LDH, 也可以检测L-LDH, 或两者的混合物。
- 本试剂盒的基本原理如下。在LDH的作用下, NAD⁺被还原生成NADH, NADH和WST-8反应生成NAD⁺和水溶性的甲臞染料(Formazan dye), 在450nm波长下产生吸收峰, 从而可以通过比色来定量LDH的活性。吸光度与LDH活性成线性正相关。该酶联反应原理的示意图如下(图1)。

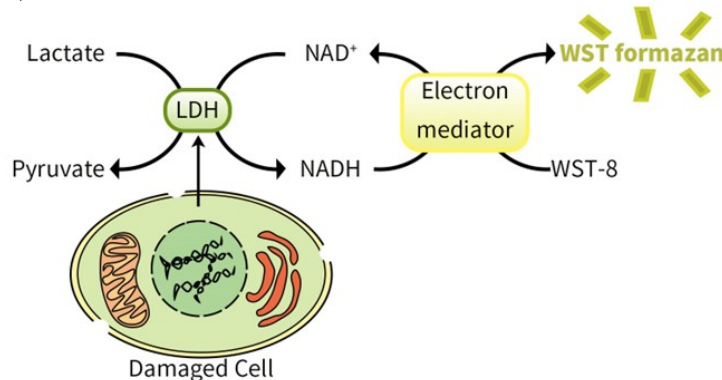


图1. 碧云天乳酸脱氢酶释放检测试剂盒(WST-8法) (C0019)检测原理图。

- **本试剂盒检测灵敏度高, 线性范围宽。**在样品体积为100 μ l时, 可检测活力低至0.15mU/ml的乳酸脱氢酶, 在0.15-50mU/ml活力范围内有良好的线性关系。本试剂盒提供了乳酸脱氢酶标准溶液, 可以通过绘制标准曲线(图2), 计算出样品中的乳酸脱氢酶的活性。

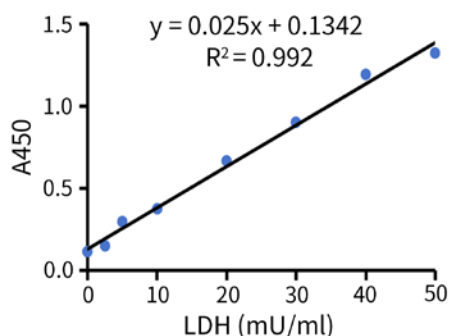


图2. 碧云天乳酸脱氢酶释放检测试剂盒(WST-8法) (C0019)对乳酸脱氢酶标准品的检测效果图。各浓度的LDH标准品加入LDH检测工作液后，37°C孵育30分钟，测定A450，在0.15-50mU/ml范围内有良好的线性关系。实际检测数据会因检测仪器、实验条件等的不同而存在差异，本图仅供参考。

- 本试剂盒可检测细胞培养液、细胞裂解液等样品中LDH的活性。
- 按照使用说明推荐的使用量进行检测，本产品小包装可进行100次检测，中包装可进行500次检测。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
C0019S-1	LDH Release Assay Buffer	10ml
C0019S-2	Chromogen Solution	1ml
C0019S-3	Lactate Dehydrogenase (2.5U/ml)	50μl
C0019S-4	Stop Solution	2.2ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
C0019M-1	LDH Release Assay Buffer	50ml
C0019M-2	Chromogen Solution	5ml
C0019M-3	Lactate Dehydrogenase (2.5U/ml)	250μl
C0019M-4	Stop Solution	12ml
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，一年有效。Chromogen Solution须避光保存。试剂盒解冻后可以短期4°C存放，2-3天内有效。

注意事项：

- 冷冻会使样品中部分乳酸脱氢酶失活，样品在4°C可放置2-3天。建议样品准备好后尽量当天完成测定。
- LDH Release Assay Buffer需要完全解冻并平衡至室温后再使用，否则会影响检测结果。其它溶液使用时应在冰上进行。
- 在检测细胞培养液中的乳酸脱氢酶时，由于血清含有乳酸脱氢酶，使用含血清的培养液会增加背景读数，在检测时一定要设置没有细胞，但加入了相同体积培养液的对照孔，以用于消除背景。血清含量越高，背景值越高。如果对于实验无明显影响，建议使用灭活血清，这样血清中的乳酸脱氢酶会被很大程度上失活，大幅降低背景。如果对于实验无明显影响，实验时可以使用无血清培养液或血清浓度较低的培养液，这样能有效降低血清中乳酸脱氢酶的本底活性。
- 细胞过度生长、密度过高、离心速度过大、培养箱内外温差过大，都会造成细胞释放乳酸脱氢酶增加。此外，不同的细胞乳酸脱氢酶的含量也存在一定差异。
- 未加终止液时，随着时间延长，吸光值会逐渐增大。加入终止液后，显色可以稳定保存48小时。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 细胞样品的准备。

根据细胞的大小和生长速度将适量细胞接种到96孔等多孔细胞培养孔板中，使待检测时细胞密度不超过80-90%满为宜。同时设置不含细胞的培养液孔作为背景对照，按照细胞培养的常规方法培养细胞。如有需要，可加入不同药物进行处理，并设置适当对照。药物刺激完毕后，直接取细胞培养上清或将细胞培养板用多孔板离心机400×g离心5分钟，所得上清即为待测样品。

注：在进行药物处理时，须在背景对照等对照孔中加入对应的药物溶剂以排除药物溶剂对实验的干扰。

2. 试剂盒的准备。

a. 融解LDH Release Assay Buffer，平衡至室温后混匀备用。其它试剂存放于冰浴备用，使用完毕后宜立即按照试剂盒要求的

条件保存。

- b. LDH检测工作液(LDH Assay Working Solution)的配制：按照每个检测反应100 μ l的体积配制适量的LDH检测工作液。均匀混合91 μ l LDH Release Assay Buffer和9 μ l Chromogen Solution，即可配制成100 μ l LDH检测工作液。根据待检测样品(包括对照)的数量，配制适量的LDH检测工作液，具体配制方法参考下表。配制好的LDH检测工作液可以4 $^{\circ}$ C避光保存1天，现配现用效果更佳。配制和使用过程中均要注意适当避光。

Samples	1	10	20	50
LDH Release Assay Buffer	91 μ l	910 μ l	1820 μ l	4550 μ l
Chromogen Solution	9 μ l	90 μ l	180 μ l	450 μ l
LDH Assay Working Solution	100μl	1ml	2ml	5ml

3. 标准曲线与样品的检测。

- a. LDH标准曲线的设置。

取12 μ l Lactate Dehydrogenase (2.5U/ml)，加入588 μ l LDH Release Assay Buffer，混匀，配制成50mU/ml乳酸脱氢酶标准溶液。分别取50mU/ml的乳酸脱氢酶标准溶液0、5、10、20、40、60、80、100 μ l加入96孔板的标准品孔中，并用LDH Release Assay Buffer补足至100 μ l，此时，标准曲线各孔的LDH浓度分别为0、2.5、5、10、20、30、40、50mU/ml，LDH量分别为0、0.25、0.5、1、2、3、4、5mU。

注：初次检测，可以按照以上浓度设置标准曲线。在后续的实验，可以根据样品中LDH的活性对标准曲线的浓度范围进行适当调整。

- b. 取1-100 μ l样品或稀释后的样品加入96孔板样品孔中，并加入LDH Release Assay Buffer至样品孔中，补足至100 μ l。

注：为确保样品数值在标准曲线范围内，建议进行预实验将样品设置多个稀释倍数，以确定样品中LDH的大致活性，如果数值不在标准曲线范围内，请调整样品的稀释倍数或者样品的量。样品总稀释倍数记为n(例如本步骤中对样品进行了10倍稀释，加入的‘稀释后的样品’为50 μ l，则n=10 \times 100/50=20)。

- c. 标准品孔和样品孔各孔加入100 μ l LDH检测工作液，混匀，37 $^{\circ}$ C避光孵育10-30分钟。孵育时可用铝箔包裹后置于水平摇床或侧摆摇床上缓慢摇动。推荐使用BeyoShakerTM数字式翘板摇床(E6673)。

- d. 在每个孔中加入20 μ l Stop Solution，混匀，然后在450nm处测定吸光度。如无450nm滤光片，可以使用420-480nm的滤光片。可以选择设定600nm(或600nm以上，如650nm)作为参比波长(也称参考波长)，450nm吸光度的读数扣除参比波长的吸光度读数即可作为实测读数(A450)。

注：为确保检测效果，可以不添加终止液，在不同时间点测定吸光度，直到获得比较理想的吸光度数据为止，然后再酌情添加Stop Solution。

- e. 建立LDH标准曲线，并计算样品中释放的乳酸脱氢酶活性。如果样品背景对照孔的信号比较高，样品的信号值应减去样品背景对照的信号值。LDH标准曲线可以参考图2，在0.15-50mU/ml范围内有良好的线性关系。Released LDH Activity的计算公式如下：

$$\text{Released LDH Activity (mU/ml)} = B \times n$$

注1：B为步骤3e根据标准曲线确定的LDH活性(mU/ml)；

n为步骤3b中样品总稀释倍数。

注2：对于LDH酶活性的检测，也可以使用碧云天的乳酸脱氢酶检测试剂盒(WST-8法)(P0392/P0393/P0395)，可分别检测D-LDH、L-LDH和总LDH。

参考文献：

- Markert CL. Cell Biochem Funct. 1984. 2(3):131-4.
- Feng Y, Xiong Y, Qiao T, Li X, Jia L, et al. Cancer Med. 2018. 7(12):6124-6136.
- Broussas M, Broyer L, Goetsch L. Methods Mol Biol. 2013. 988:305-17.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C0016/C0017	乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒	100次/500次
C0018	乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(WST-8法)	100次/500次
C0019	乳酸脱氢酶释放检测试剂盒(WST-8法)	100次/500次
P0392S	D-乳酸脱氢酶检测试剂盒(WST-8法)	100次
P0393S	L-乳酸脱氢酶检测试剂盒(WST-8法)	100次
P0395S	总乳酸脱氢酶检测试剂盒(WST-8法)	100次

Version 2024.12.04