

D-乳酸脱氢酶检测试剂盒(WST-8法)

产品编号	产品名称	包装
P0392S	D-乳酸脱氢酶检测试剂盒(WST-8法)	100次

产品简介:

- 碧云天研发的D-乳酸脱氢酶检测试剂盒(WST-8法) (D-Lactate Dehydrogenase Assay Kit with WST-8, 简称D-LDH Assay Kit with WST-8)是一种基于WST-8的显色反应, 通过比色法快速、高灵敏地对血清、血浆、尿液等生物体液、组织、细胞以及组织或细胞培养上清样品中D-乳酸脱氢酶活性进行检测的试剂盒。通常0.1-1 μ l血清或血浆样品就足够用于本试剂盒的检测。本试剂盒检测的是NAD⁺依赖型的D-乳酸脱氢酶(NAD⁺-dependent D-lactate dehydrogenase)。
- 乳酸脱氢酶(Lactate Dehydrogenase, 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]。乳酸脱氢酶根据其结合的辅酶的不同, 可以分为NAD⁺-依赖型乳酸脱氢酶(NAD⁺-dependent lactate dehydrogenase)和NAD⁺-非依赖型乳酸脱氢酶(NAD⁺-independent lactate dehydrogenase)。NAD⁺-依赖型乳酸脱氢酶分布更为广泛, 在人体、动物以及微生物中都普遍存在。据乳酸脱氢酶的底物特异性, 乳酸脱氢酶可以分为D-乳酸脱氢酶(D-Lactate Dehydrogenase, D-LDH)和L-乳酸脱氢酶(L-Lactate Dehydrogenase, L-LDH) [3]。
- D-乳酸脱氢酶能催化D-乳酸(D-Lactate)与丙酮酸(Pyruvate)的相互转化[3,4]。D-乳酸脱氢酶是甲基乙二醛(Methylglyoxal, MGO)途径的重要酶, 负责将该途径的终产物D-乳酸转化为丙酮酸, D-乳酸的过度积累可能导致D-乳酸酸中毒(D-lactic acidosis or D-lactate encephalopathy) [5]。此外, 在食管鳞状细胞癌(Esophageal Squamous Cell Carcinoma, ESCC)的肿瘤干细胞(Cancer Stem Cells, CSCs)中, D-乳酸脱氢酶显著高表达, 高水平的D-乳酸脱氢酶与ESCC患者的预后不良有关[6]。
- 本试剂盒的检测原理如图1所示。D-乳酸脱氢酶催化D-乳酸(D-Lactate)氧化生成丙酮酸(Pyruvate), 在这一过程中NAD⁺还原为NADH; 生成的NADH在电子耦合试剂1-mPMS (1-Methoxy-5-methylphenazinium methyl sulfate)的作用下将WST-8还原成橙黄色的甲瓩(Formazan), 在450nm左右有最大吸收峰。催化生成的甲瓩的量与D-乳酸脱氢酶的活性呈正比, 通过测定450nm处的吸光值可以非常灵敏地检测样品中D-乳酸脱氢酶的活性。

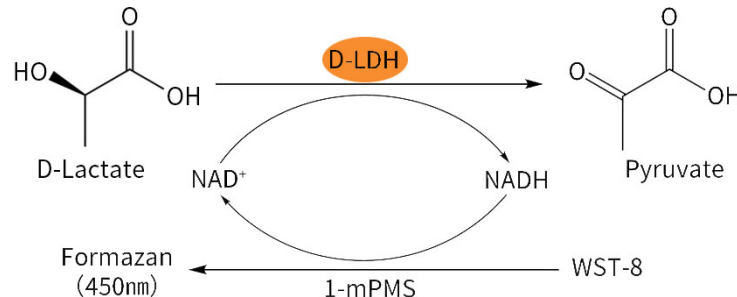


图1. 碧云天D-乳酸脱氢酶检测试剂盒(WST-8法) (P0392)检测原理图。

- **本试剂盒检测灵敏度高, 线性范围宽, 样品用量少。**本试剂盒能特异性检测D-乳酸脱氢酶, 而不检测L-乳酸脱氢酶。在样品体积为50 μ l时, 可以检测活性低至0.5mU/ml的D-乳酸脱氢酶, 在0.5-100mU/ml活力范围内有良好的线性关系。本试剂盒提供了D-乳酸脱氢酶标准溶液, 可以通过绘制标准曲线(图2A), 计算出样品中D-乳酸脱氢酶的活性。如需检测L-乳酸脱氢酶和总乳酸脱氢酶的活性, 推荐使用碧云天的L-乳酸脱氢酶检测试剂盒(WST-8法) (P0393)和总乳酸脱氢酶检测试剂盒(WST-8法) (P0395)。

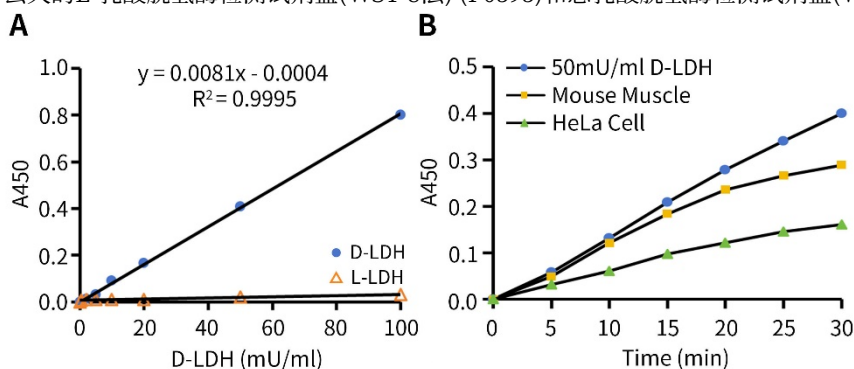


图2. 碧云天D-乳酸脱氢酶检测试剂盒(WST-8法) (P0392)对D-乳酸脱氢酶标准品、小鼠肌肉以及HeLa细胞样品的检测效果图。图A为本试剂盒对D-乳酸脱氢酶标准品的检测效果图, 在0.5-100mU/ml范围内有良好的线性关系, 并且对于L-乳酸脱氢酶的检测呈现阴性; 图B为本试剂盒检测50mU/ml D-乳酸脱氢酶标准品、蛋白量为7.5μg的小鼠腿肌裂解样品(Mouse Muscle)、蛋白量为7.4 μg的HeLa细胞裂解样品(HeLa Cell)时反应30分钟内的吸光值变化图。实际检测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- **本试剂盒提供的检测裂解液有一定的通用性。**使用本试剂盒中的BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay裂解获得的细胞或组织样品, 也可以用于碧云天生产的其它代谢类试剂盒中同样使用BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay进行裂解的样品检测, 通用性强; 还可用于检测蛋白浓度、进行SDS-PAGE或一些较易溶解蛋白的Western检测。
- **本试剂盒检测速度快、应用范围广。**本试剂盒可用于小鼠、大鼠、人等的血清、血浆、尿液等生物体液, 细胞培养上清、组织或细胞样品等的检测。整个检测过程约1小时即可完成。本试剂盒不仅适合少量样本的检测, 也非常适合高通量筛选(High-throughput screening)的自动化操作系统。
- 按照使用说明操作, 用于96孔板检测时, 本试剂盒小包装可以进行100次检测。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
P0392S-1	BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay	20ml
P0392S-2	D-LDH Assay Buffer	20ml
P0392S-3	Substrate	200μl
P0392S-4	D-Lactate Solution (50X)	200μl
P0392S-5	WST-8	200μl
P0392S-6	D-Lactate Dehydrogenase (10U/ml)	50μl
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存, 一年有效。其中WST-8须避光保存。

注意事项:

- 本试剂盒仅能检测D-乳酸脱氢酶, 不能检测L-乳酸脱氢酶。
- BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay、D-LDH 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。
- Substrate从-20°C取出在融解过程中可能会有析出, 平衡至室温后析出的部分会溶解, 不会对检测结果产生影响。
- 血清、血浆等样品如果在4°C保存, 保存的时间不得超过2周, 否则会影响检测结果的准确性。通常血清样品宜在-20°C保存, -80°C保存更佳。
- 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. 样品的准备:

- a. **血液样品的准备:** 对于血清样品, 将全血在常温如25°C下放置30分钟-2小时, 不要剧烈摇晃以免溶血, 待全血自然凝固并析出血清后, 4°C约1000-2000×g离心10分钟, 取黄色上清即得血清, 注意不要吸取白色或淡黄色沉淀; 对于血浆样品, 将全血用肝素或者EDTA进行抗凝, 4°C约1000-2000×g离心10分钟, 取黄色或淡黄色上清即得血浆, 注意不要吸取白色沉淀。血清和血浆都需置于冰上, 如果不能立即检测, 也可以分装并短期保存于-20°C或-80°C。对于冻存的样品, 在检测前解冻后冰浴存放备用, 使用前必须混匀。
- b. **细胞或组织样品的准备:** 对于培养的贴壁细胞, PBS (C0221A)洗涤一次并吸净残留液体。对于培养的悬浮细胞, 先适当离心(如100-500×g, 5分钟)收集细胞到离心管内, 弃上清并吸净残留液体。按照每100万细胞加入100-200μl BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay的比例加入裂解液, 适当吹打, 冰浴5-10分钟以充分裂解细胞。4°C约12,000×g离心3-5分钟, 取上清用于后续检测。对于组织样品, 按照每10mg组织加入100μl BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay的比例, 使用TissueMaster™高通量组织研磨仪(1.5/2ml×48) (E6618)、TissueMaster™手持式组织研磨仪(E6600/E6607)或玻璃匀浆器在约4°C或冰浴等低温条件下进行匀浆。4°C约12,000×g离心3-5分钟, 取上清用于后续检测。以上所有操作均需在4°C或冰上操作。制备好的细胞或组织样品如果不能立即检测, 可以-20°C或-80°C冻存。
- c. **细胞培养上清样品的准备:** 对于贴壁细胞, 直接取培养液; 对于悬浮细胞, 离心取培养液。

2. 试剂盒的准备:

- a. 融解BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay、D-LDH 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. **WST-8显色工作液(WST-8 Working Solution)的配制:** 按照每个反应50μl的体积配制适量的显色工作液。均匀混合44μl D-LDH Assay Buffer、2μl Substrate、2μl D-Lactate Solution、2μl WST-8, 即可配制成50μl WST-8显色工作液。根据待检测样品(包括标准品)的数量, 配制适量的WST-8显色工作液。具体配制方法参考下表。配制好的WST-8显色工作液如果置于

4°C或冰浴避光保存，可以在当天使用，但建议尽量现配现用。

Samples	1	10	20	50
D-LDH Assay Buffer (μl)	44	440	880	2200
Substrate (μl)	2	20	40	100
D-Lactate Solution (μl)	2	20	40	100
WST-8 (μl)	2	20	40	100
WST-8 Working Solution (μl)	50	500	1000	2500

注：NADH和NADPH以及会影响NADH和NADPH水平的物质等的存在会对D-乳酸脱氢酶的检测产生干扰。如果样品含有干扰物质，须同时设置样品的背景对照孔，加入不含D-Lactate Solution的WST-8显色工作液，即配制WST-8显色工作液时2μl D-Lactate Solution用D-LDH Assay Buffer替代。计算时样品孔的读数需要减去背景对照孔的读数。

3. 样品测定：

a. D-乳酸脱氢酶标准曲线的设置。

取2μl D-Lactate Dehydrogenase (10U/ml)，加入198μl D-LDH Assay Buffer，混匀，配制成100mU/ml D-乳酸脱氢酶标准溶液。分别取100mU/ml的D-乳酸脱氢酶标准溶液0、0.25、0.5、1、2.5、5、10、25、50μl加入96孔板的标准品孔中，并用D-LDH Assay Buffer补足至50μl，此时，标准曲线的浓度分别为0、0.5、1、2、5、10、20、50、100mU/ml。

注：由于酶溶液的用量较少且易沉降，必须注意在使用前先轻轻离心一下，然后适当混匀后再使用。

b. 取1-50μl样品或稀释后的样品至96孔板样品孔中，并加入D-LDH Assay Buffer至样品孔中，补足至50μl。同时设置仅含D-LDH Assay Buffer的孔为空白对照。

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D-乳酸脱氢酶的大致活性，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25μl，则n=10×50/25=20）。

c. 各孔加入WST-8显色工作液50μl，混匀。

d. 立即使用适当的酶标仪在450nm测定吸光度。此时记录0分钟读值为A₁。

e. 37°C反应20-30分钟，测定A₄₅₀，记为A₂。吸光值的升高取决于D-乳酸脱氢酶的活性，ΔA = A₂ - A₁。

注：为取得最佳的检测结果，反应时间可以根据待测样品中的D-乳酸脱氢酶活性进行调整，但必须确保读数在标准曲线的范围内。对于D-乳酸脱氢酶活性较高的样品，建议测定总时间为20或30分钟，对应的测定间隔时间设为2分钟或5分钟。对于D-乳酸脱氢酶活性较低的样品，可以延长测定总时长为1小时，对应的测定间隔时间设为10或20分钟；也可以连续测定30分钟，每隔1或2分钟测定1次，最后取呈线性的时间点前的数据用于分析或计算。

f. 建立D-乳酸脱氢酶标准曲线，将ΔA代入标准曲线，即可计算出反应时间内样品中D-乳酸脱氢酶的活性B。D-乳酸脱氢酶标准曲线可以参考图2A，在0.5-100mU/ml范围内有良好的线性关系。D-LDH活性计算公式如下：

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

注：B为步骤3f中根据标准曲线确定的D-LDH活性(mU/ml)；

n为步骤3b中样品总稀释倍数。

D-乳酸脱氢酶活力单位的定义：1个酶活力单位(unit, U)在25或37°C，pH7.0的条件下，在1分钟内可以催化生成1μmol丙酮酸。

参考文献：

1. Markert CL. Cell Biochem Funct. 1984. 2(3):131-4.
2. Feng Y, Xiong Y, Qiao T, Li X, Jia L, et al. Cancer Med. 2018. 7(12):6124-6136.
3. Cristescu ME, Innes DJ, Stillman JH, Crease TJ. BMC Evol Biol. 2008. 8:268.
4. Razeto A, Kochhar S, Hottinger H, Dauter M, Wilson KS, et al. J Mol Biol. 2002. 318(1):109-119.
5. Ewaschuk JB, Naylor JM, Zello GA. J Nutr. 2005. 135(7):1619-1625.
6. Lv M, Gong Y, Liu X, Wang Y, Wu Q, et al. Signal Transduct Target Ther. 2023. 8(1):302.

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
C0018S/M	乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(WST-8法)	100次/500次
S0204S	D-乳酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0208S	L-乳酸检测试剂盒(WST-8法)	100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