

## 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:  $\text{乳酸} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{丙酮酸} + \text{NADH} + \text{H}^+$ , 其中: L→P 为正向反应; P→L 为逆向反应。

Leagene 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, 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, 不适用于临床诊断或其他用途。

### 产品组成:

| 名称                      | 编号 | CT0027 | CT0027 | Storage |
|-------------------------|----|--------|--------|---------|
|                         |    | 100T   | 500T   |         |
| 试剂(A): LDH Assay Buffer |    | 3ml    | 15ml   | 4°C 避光  |
| 试剂(B): NAD              |    | 1 支    | 2 支    | -20°C   |
| 试剂(C): 苯肼显色液            |    | 3ml    | 15ml   | 4°C 避光  |
| 试剂(D): 碱性显色液            |    | 10ml   | 50ml   | RT      |
| 试剂(E): LDH 释放剂(10×)     |    | 2ml    | 10ml   | RT      |
| 使用说明书                   |    | 1 份    |        |         |

### 自备材料:

- 1、96 孔板培养的待测组和对照组细胞样品、无菌 PBS、培养液、蒸馏水
- 2、多孔板离心机、96 孔板或离心机、离心管、恒温箱或水浴锅、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(无细胞的培养液)、样品对照孔 B(未经药物处理的对照细胞)、最大酶活对照孔 C(未经药物处理的细胞后经裂解的样品)、药物处理样品孔 D(经药物处理的细胞)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 5μl,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 5μl,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、配制 NAD 溶液:取 1 支 NAD(粉末),溶解于 1.5ml 去离子水,即成。

3、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)          | 5       |
| LDH Assay Buffer   | 25      |
| NAD 溶液             | 5       |
| 混匀, 37°C 孵育 15min。 |         |
| 苯肼显色液              | 25      |
| 混匀, 37°C 孵育 15min。 |         |
| 碱性显色液              | 100     |
| 蒸馏水                | 150     |

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

### 计算:

$$\text{细胞毒性或死亡率} = (A_D - A_B) / (A_C - A_B) \times 100\%$$

如同时检测一已知浓度  $c$  的 LDH 酶标准品对应吸光度值  $A_V$  和标准空白对照吸光度值  $A_{V0}$ ,则可粗略计算出样品中的酶活力:

$$\text{待测样品中 LDH 活力单位 (mU/ml)} = (A_B - A_A) / (A_V - A_{V0}) \times c$$

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 2.5~10ul 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。
- 8、试剂开封后请尽快使用, 以防影响后续实验效果。
- 9、为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

**有效期:** 12 个月有效; 低温运输, 按要求保存。

### 相关产品:

| 产品编号   | 产品名称                        |
|--------|-----------------------------|
| CA0005 | 氨苄青霉素溶液(Ampicillin,50mg/ml) |
| CT0026 | MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒          |
| DH0006 | 苏木素伊红(HE)染色液(醇溶)            |
| DP0013 | GUS 染色液(即用型)                |
| PT0001 | BCA 蛋白定量试剂盒                 |
| TC0699 | 植物总糖和还原糖检测试剂盒(DNS 比色法)      |
| TC0713 | 葡萄糖检测试剂盒(GOD-POD 比色法)       |
| TE0158 | 乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒(二硝基苯肼微板法)   |

**文献引用:**

- 1、 Xiaofan Ding,Mengxue Sun,Fusheng Guo,et al.Picrasidine S Induces cGAS-Mediated Cellular Immune Response as a Novel Vaccine Adjuvant.Advanced Science.June 2024.10.1002/advs.202310108.(IF 14.3)
- 2、 Nan Gao,Yiran Huang,Shisuo Jing,et al.Environment-responsive dendrobium polysaccharide hydrogel embedding manganese microsphere as a post-operative adjuvant to boost cascaded immune cycle against melanoma.Theranostics.June 2024.10.7150/thno.94354.(IF 12.4)
- 3、 Qiansheng Li,Hong Lu,Tian Tian,et al.Insights into the Acceleration Mechanism of Intracellular N and Fe Co-doped Carbon Dots on Anaerobic Denitrification Using Proteomics and Metabolomics Techniques.ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY.January 2024.10.1021/acs.est.3c08625.(IF 10.8)
- 4、 Lei Yang,Xuan Guo,Xingtai Mao,et al.Hepatic toxicity of fluorene-9-bisphenol (BHPF) on CD-1 mice.ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY.May 2021.10.1016/j.ecoenv.2021.112298.(IF 6.291)
- 5、 Xin Wen,Zheng Wang,Qi Liu,et al.Acetobacter pasteurianus BP2201 alleviates alcohol-induced hepatic and neuro-toxicity and modulate gut microbiota in mice.Microbial Biotechnology.June 2023.10.1111/1751-7915.14303.(IF 5.7)
- 6、 Chao Li,Bin Xu,Heng Song,et al.Calcium dobesilate prevents PLD-induced hand-foot syndrome by alleviating capillary endothelial tight junction injury via the HA/CD44 pathway.American Journal of Cancer Research.July 2023.PMID:37559988.(IF 5.3)
- 7、 Qiao Wanchen,Zang Zhaoxia,Li Dawei,et al.Liensinine ameliorates ischemia - reperfusion-induced brain injury by inhibiting autophagy via PI3K/AKT signaling.FUNCTIONAL & INTEGRATIVE GENOMICS.April 2023.10.1007/s10142-023-01063-7.(IF 2.9)

注：更多使用本产品的文献请参考产品网页