

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

乳酸脱氢酶活性测定试剂盒

Lactate Dehydrogenase (LDH) Activity Assay Kit

产品货号: BC00003

产品规格: 100T/500T

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们:

✉ 邮箱 (销售) order@enkilife.cn

✉ 邮箱 (技术支持) tech@enkilife.cn

☎ 公司电话 027-87002838

🌐 网址 www.enkilife.cn



订阅微信公众号
获取更多技术
信息及前沿动态

保质期: 请见试剂盒外包装标签。

技术支持: 为了更好地给您提供服务, 联系时请告知产品外包装标签上批号。

基本信息

产品中文名称	乳酸脱氢酶活性测定试剂盒
产品英文名称	Lactate Dehydrogenase (LDH) Activity Assay Kit
检测方法	Colorimetric
样品类型	血清、血浆、组织、细胞
检测类型	Enzyme activity
检测仪器及波长	酶标仪（490nm。双波长测定参考波长：600nm 或大于 600nm 的任一波长）

产品简介

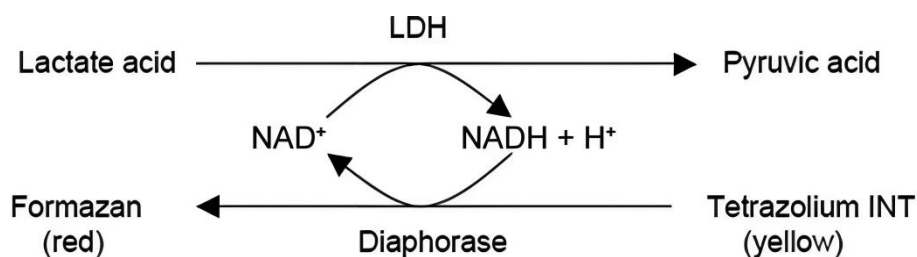
乳酸脱氢酶活性测定试剂盒 Lactate Dehydrogenase (LDH) Activity Assay Kit，也称乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(LDH Cytotoxicity Assay Kit)或乳酸脱氢酶释放检测试剂盒 (LDH Release Assay Kit)。细胞凋亡或坏死而造成的细胞膜结构的破坏会导致细胞浆内的酶释放到培养液里，其中包括酶活性较为稳定的 LDH。通过检测从质膜破裂的细胞中释放到培养液中的 LDH 的活性，就可以实现对细胞毒性的定量分析。LDH 释放被看作细胞膜完整性的重要指标，并被广泛用于细胞毒性检测。

产品特点

★ 可检测的样本类型丰富：本试剂盒可检测细胞培养液、细胞裂解液等样品中乳酸脱氢酶的活性，也常用于以 LDH 释放为指标的细胞毒性检测；同时，基于细胞总乳酸脱氢酶活性的检测，本试剂盒也可以用于检测细胞增殖和细胞毒性检测。

检测原理

在乳酸脱氢酶的作用下，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)，在 490nm 波长下产生吸收峰，从而可以通过比色来定量乳酸脱氢酶的活性。吸光度与乳酸脱氢酶活性成线性正相关。该酶联反应原理的示意图如下：



产品组分

产品名称	包装规格 (100T)	包装规格 (500T)	保存方式
LDH 释放试剂	1.5ml	7.5ml	-20℃
乳酸溶液	1ml/支, 两支	10ml	-20℃
酶溶液	1ml/支, 两支	10ml	-20℃, 需注意避免反复冻融。
INT 溶液(10×)	0.2ml	0.2ml	-20℃, 需避光保存。
INT 稀释液	1ml/支, 两支	1ml/支, 两支	-20℃
96 孔酶标板	1 板	5 板	RT
96 孔覆膜	2 张	10 张	RT

保存条件

未拆封的试剂盒可在 -20℃保存 12 个月。试剂盒解冻后可以短期 2-8℃ 存放, 2-3 天内有效。

实验前准备

• 样品处理

方法一：LDH 释放检测

1. 根据细胞的大小和生长速度将适量细胞接种到 96 孔细胞培养板中, 使待检测时细胞密度不超过 80-90%满。
2. 吸去培养液, 用 PBS 液洗涤一次。换新鲜培养液(推荐使用含 1%血清的低血清培养液或适当的无血清培养液), 将各培养孔分成如下几组: 包括无细胞的培养液孔(背景空白对照孔), 未经药物处理的对照细胞孔(样品对照孔), 未经药物处理的用于后续裂解的细胞

孔(样品最大酶活性对照孔), 以及药物处理的细胞孔(药物处理样品孔), 并做好标记。按照实验需要给予适当药物处理(如加入 0-10 μ l 左右特定的药物刺激, 可设置不同浓度, 不同处理时间, 对照孔中需加入适当的药物溶剂对照), 继续按常规培养。到预定的检测时间点前 1 小时, 从细胞培养箱里取出细胞培养板, 在“样品最大酶活性对照孔”中加入试剂盒提供的 LDH 释放试剂, 加入量为原有培养液体积的 10%。加入 LDH 释放试剂后, 反复吹打数次混匀, 然后继续在细胞培养箱中孵育。

3. 到达预定时间后, 将细胞培养板用多孔板离心机 400g 离心 5min。分别取各孔的上清液 120 μ l, 加入到一新的 96 孔板相应孔中, 随即进行样品测定。

方法二: 细胞内总 LDH 的检测

1. 细胞毒性检测:

根据细胞的大小和生长速度将适量细胞接种到 96 孔细胞培养孔板中, 使待检测时细胞密度不超过 80-90%满。加入不同药物进行处理, 并设置适当对照。药物刺激完毕后, 将细胞培养板用多孔板离心机 400g 离心 5min。尽量吸除上清, 加入 150 μ l 用 PBS 稀释了 10 倍的试剂盒提供的 LDH 释放试剂(10 体积 PBS 中加入 1 体积 LDH 释放试剂并混匀), 适当摇晃培养板混匀, 然后继续在细胞培养箱中孵育 1 小时。随后将细胞培养板用多孔板离心机 400g 离心 5min。分别取各孔的上清液 120 μ l, 加入到一新的 96 孔板相应孔中, 随即进行样品测定。

2. 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 孔细胞培养孔板中, 使促进细胞增殖的药物刺激后细胞不超过 80-90%满为宜。使用不同的药物刺激细胞, 并设置适当对照。药物刺激完毕后, 将细胞培养板用多孔板离心机 400g 离心 5min。尽量吸除上清, 加入 150 μ l 用 PBS 稀释了 10 倍的试剂盒提供的 LDH 释放试剂(10 体积 PBS 中加入 1 体积 LDH 释放试剂并混匀), 适当摇晃混匀, 然后继续在细胞培养箱中孵育 1 小时。随后将细胞培养板用多孔板离心机 400g 离心 5min。分别取各孔上清液 120 μ l, 加入到一新的 96 孔板相应孔中, 随即进行样品测定。

注: LDH 释放检测更加常用, 细胞内总 LDH 检测通常可以使用 MTT、WST-1 或 CCK-8 等方法替代。

方法三：样品中 LDH 的检测

本试剂盒也可用于不同样品中的 LDH 检测。样本要求：血清样本中不能有溶血，因为红细胞内的 LDH 活力较血清内高约 100 倍；样本中不能含有 SDS、Tween20、NP-40、Triton X-100 等去污剂；不能使用草酸盐抗凝。

1. 血清血浆等液体样本：无需前处理。
2. 组织样本：组织处理的匀浆介质为生理盐水(0.9% NaCl)或 PBS(0.01 M, pH 7.4)。匀浆后，4℃，10000×g 离心 10min，取上清置于冰上待测。
3. 细胞样本：取约 10^6 个细胞加入 300μL 生理盐水(0.9% NaCl)或 PBS(0.01 M, pH 7.4)进行机械匀浆或超声破碎。匀浆后，4℃，10000×g 离心 10min，取上清置于冰上待测。
4. 样本在测定前可以使用 LDH 释放试剂稀释 2-3 个不同的浓度进行测定，确定稀释倍数，使得 LDH 浓度在本试剂盒的线性范围内 (0-800 mU/ml)。测定时样本取 120μl 加入 96 孔板并进行后续检测。

• 试剂盒的准备工作

1. INT 溶液(1×)的配制：根据所需的 INT 溶液(1×)的量，取适量 INT 溶液(10×)用 INT 稀释液稀释至 1×。例如，取 20μl INT 液(10×)，加入 180μl INT 稀释液，混匀后即配置为 200μl INT 溶液(1×)。INT 溶液(1×)宜现配现用，配置后 4℃ 保存可于当天使用，不宜配置后冻存。
2. LDH 检测工作液的配置：根据待测定的样品数(含对照)，参考下表在临检测前新鲜配制适量的检测工作液。注意：LDH 检测工作液必须现配现用，配制和使用过程中均要注意适当避光。

检测次数	1 次	10 次	20 次	50 次
乳酸溶液	20μl	200μl	400μl	1ml
INT 溶液(1×)	20μl	200μl	400μl	1ml
酶溶液	20μl	200μl	400μl	1ml
总体积	60μl	600μl	1.2ml	3ml

3. (选做)如果希望进行 LDH 酶活性的绝对定量，需自备 LDH 标准品，并新鲜配制不同浓

度 LDH 标准品, 如 800mU/ml、400mU/ml、200mU/ml、100mU/ml、0mU/ml。

操作流程

1. 各孔分别加入 60 μ l LDH 检测工作液。
2. 混匀, 室温(约 25 $^{\circ}$ C)避光孵育 30min(可用铝箔包裹后置于水平摇床或侧摆摇床上缓慢摇动)。然后在 490nm 处测定吸光度。使用 600nm 或大于 600nm 的任一波长作为参考波长进行双波长测定。
3. 计算(测得的各组吸光度均应减去背景空白对照孔吸光度)。
4. 细胞毒性或死亡率(%)=(处理样品吸光度 - 样品对照孔吸光度) / (细胞最大酶活性的吸光度 - 样品对照孔吸光度) $\times$ 100。
5. 可绘制细胞毒性曲线: 纵坐标为实际吸光度, 横坐标为药物浓度; 据此可计算该药物作用特定时间的半致死剂量 LD50。

结果计算

附录 1

可同时测定一已知浓度的 LDH 酶标准品对应的吸光度值, 参考以下公式粗略计算出样品中 LDH 酶活力:

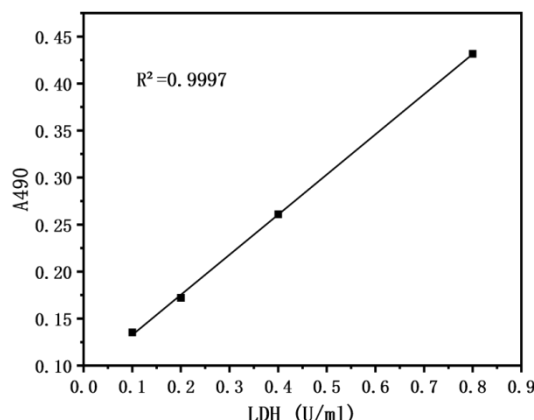
待测样品中 LDH 活力单位(mU/ml) = (样品孔吸光度 - 背景空白对照孔吸光度) / (标准管吸光度 - 标准空白管吸光度) $\times$ 标准品浓度(mU/ml);

根据计算结果可以比较不同样品处理组间有无统计学差异等。

附录 2

若需准确计算出 LDH 酶活性的绝对活性, 可通过一系列 LDH 标准品及相应测得的吸光度值绘制标准曲线, 通过标准曲线相应公式计算出样品中 LDH 的酶活性。

各孔数值减去空白对照后, 以检测的吸光度(OD490)为纵坐标, LDH 酶活力(mU)为横坐标, 绘制 LDH 标准曲线。同时计算出该趋势线的公式。



$A_{490nm} = k \times \text{LDH 酶活力单位(mU)} + b$ ，通过 Excel 等软件计算出趋势线的斜率 k 和截距 b 。根据上述公式计算样品中 LDH 活力。

样品实际吸光度(OD_{490}) = 样品孔测得的吸光度 - 背景空白对照孔吸光度

检测体系中 LDH 酶活力单位(mU) = $(OD_{490} - b) / k$

样品中 LDH 酶活力(mU/ml) = 检测体系中 LDH 酶活力单位(mU) / 检测样品体积。

注意事项

1. 冷冻会使样品中部分乳酸脱氢酶失活，4℃ 可放置 2-3 天。建议样品准备好后尽量当天完成测定。
2. 如果检测细胞培养液中的乳酸脱氢酶，由于血清含有乳酸脱氢酶，建议血清的使用浓度不要超过 1%，并最好使用热灭活血清。如果一定需要使用 10% 血清，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。
3. 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。
4. 如果希望进行乳酸脱氢酶活性的绝对定量，用户需自备乳酸脱氢酶标准品。
5. 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。