

乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(WST-8法)

产品编号	产品名称	包装
C0018S	乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(WST-8法)	100次
C0018M	乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(WST-8法)	500次

产品简介:

- 碧云天的乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(WST-8法) (LDH Cytotoxicity 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)、乳酸脱氢酶释放检测试剂盒(WST-8法) (LDH Release 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, 通过比色法检测细胞毒性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。
- 本试剂盒可以用于常规的乳酸脱氢酶活性的检测, 更常用于以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。
- 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, 并被广泛用于细胞毒性检测。LDH释放被认为是以前使用放射性的 ^{51}Cr 标记细胞, 随后通过 ^{51}Cr 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)。

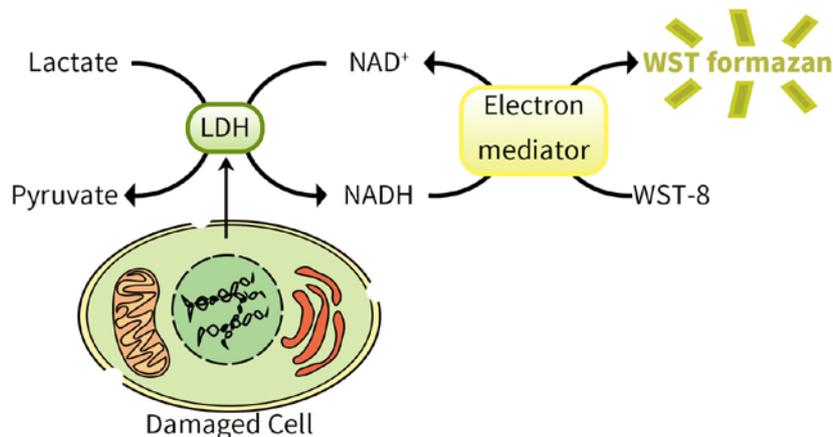


图1. 碧云天乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(WST-8法) (C0018)检测原理图。

- **本试剂盒反应更灵敏, 使用更方便。** 本试剂盒中的试剂对细胞无损害, 所以使用本试剂盒时无须去除细胞培养液, 可直接把检测工作液添加到细胞培养孔中, 可以称为一步法; 也可以取细胞培养液进行检测, 可以称为无损法, 细胞可以用于其它实验。
- 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
C0018S-1	LDH释放试剂	1ml
C0018S-2	检测缓冲液	10ml
C0018S-3	显色液	1ml
C0018S-4	终止液	2.2ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
C0018M-1	LDH释放试剂	5ml
C0018M-2	检测缓冲液	50ml
C0018M-3	显色液	5ml
C0018M-4	终止液	11ml
—	说明书	1份

保存条件:

-20℃保存, 一年有效。显色液需避光保存。试剂盒解冻后可以短期4℃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℃可放置2-3天。建议样品准备好后尽量当天完成测定。
- 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。
- 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。
- 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. 试剂盒的准备工作:

LDH检测工作液(LDH assay working solution)的配制: 按照每个检测反应100μl的体积配制适量的LDH检测工作液。均匀混合91μl检测缓冲液(Detection assay buffer)和9μl显色液(Chromogen solution), 即可配制成100μl 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℃存放3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
Detection assay buffer	91μl	910μl	1820μl	4550μl
Chromogen solution	9μl	90μl	180μl	450μl
LDH assay working solution	100μl	1ml	2ml	5ml

2. LDH标准曲线的制作(选做):

如果希望进行LDH酶活性的绝对定量, 需自备LDH标准品(D-LDH、L-LDH或LDH皆可), 并新鲜配制不同浓度LDH标准品, 如0、65、125、250、500、1000mU/ml等。如有必要, 在后续实验中可以根据样品的LDH活性, 对标准曲线的浓度范围进行适当调整。

3. 检测细胞数的确定(选做):

通常按照常规的细胞接种量进行接种即可。但由于每种细胞的LDH量有所差异, 为了得到最好的显色效果, 可以通过预实验确定最适细胞数。

- 收集细胞, 用培养液洗涤细胞后配制每毫升20万个细胞的细胞悬液, 取0、12.5、25、50、100μl细胞悬液接种到96孔细胞培养板中, 即每孔细胞数为0、2500、5,000、10,000、20,000个。分两组, 一组是总LDH组(Total LDH)、一组是未处理对照组(Untreated control), 每个细胞浓度3个重复, 过夜培养。
- 37℃继续培养一定时间(与正式实验中的药物处理时间一致)。总LDH组各孔加入10μl LDH释放试剂, 未处理对照组各孔加入10μl培养液。混匀, 室温(约25℃)避光孵育15分钟。
- 每孔加入100μl LDH检测工作液。混匀, 室温(约25℃)避光孵育0-30分钟, 由于不同细胞差异较大, 建议首次实验时, 分别测定0、5、10、20、30分钟时的吸光度, 以便确定最佳反应时间。此时可用铝箔避光包裹后置于水平摇床或侧摆摇床上缓慢摇动。孵育完毕后在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吸光度的读数减去参比波长的吸光度读数即可作为实测读数(A450)。

测试总LDH读数不超过但邻近酶标仪吸光度检测上限的细胞密度及孵育时间，即为最适细胞数和最适测试时间。

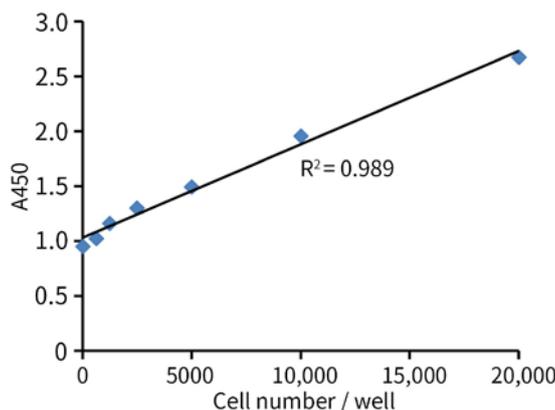


图2. 碧云天乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(WST-8法) (C0018)对A549细胞的检测效果图。使用本试剂盒检测不同细胞数量的A549细胞(含10% FBS培养液)，孵育时间为15分钟。总LDH组吸光度如图所示。实际检测数据会因检测仪器、实验条件等的不同而存在差异，本图仅供参考。

4. 细胞毒性样品的准备:

- a. 按照下表设置各实验组别，将适量细胞接种到96孔板中，过夜培养。按照下表中各组别处理方法更换培养液。注：为确保实验有效性，建议每个组别设置三个复孔。

Groups	Method	Note
未处理对照(Untreated control)	更换100μl的新鲜培养液	含细胞
背景对照(Background control)	更换100μl的新鲜培养液	不含细胞*
总LDH(Total LDH)	更换100μl的新鲜培养液	含细胞
总LDH背景(Background of total LDH)	更换100μl的新鲜培养液	不含细胞*
样品(Sample) **	更换100μl含药培养液***	含细胞
样品背景(Background of Sample)	更换100μl含药培养液***	不含细胞*
阳性对照(Positive Control)(选做，如步骤2)	更换100μl适当稀释后的LDH标准品***	

*为了避免培养液中的血清、药物、LDH释放试剂对读数的影响，需设置不含细胞、但加入了相同培养液的组，用于消除背景。

**样品组也可以是仅用于乳酸脱氢酶检测的样品。

***含药培养液：根据实验需要，在新鲜培养液中加入药物(例如加入0-5μl特定的药物)。可设置不同浓度，不同处理时间。

- b. 到达药物处理的预定时间后，总LDH组和总LDH背景组加入10μl的LDH释放试剂，其它组加入10μl的培养液。混匀，室温(约25℃)避光孵育15分钟。

5. 吸光度测定:

- a. 如果样品组细胞无其它用途，可以直接在每孔中加入100μl LDH检测工作液。如果样品组细胞还有其它用途，可直接取各孔的上清液100μl，或将培养板用多孔板离心机400×g室温离心5分钟，分别取各孔的上清液100μl。然后加入到一个新的96孔板中，接着加入100μl LDH检测工作液。
- b. 混匀，室温(约25℃)避光孵育10-30分钟，孵育的最佳时间可以通过步骤3的预实验确定。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BeyoShaker™数字式翘板摇床(E6673)。
- c. 在每个孔中加入20μl终止液，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)。

注意：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，然后再酌情添加终止液。

- d. 取各组复孔的平均值计算各组别吸光度。

样品组吸光度 = A450_{样品} - A450_{样品背景}。

总LDH组吸光度 = A450_{总LDH} - A450_{总LDH背景}。

未处理对照组吸光度 = A450_{未处理对照} - A450_{空白对照背景}。

细胞毒性或死亡率 = (样品组吸光度 - 未处理对照组吸光度) / (总LDH组吸光度 - 未处理对照组吸光度) × 100%

- e. 可绘制细胞毒性曲线：纵坐标为样品组吸光度，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。
- f. 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。各孔数值减去背景对照后，以检测的吸光度(OD450)为纵坐标，LDH酶活力(mU)为横坐标，绘制LDH标准曲线，如图3所示。同时计算出该趋势线的公式，这样就可以计算出样品中的LDH酶活力了。

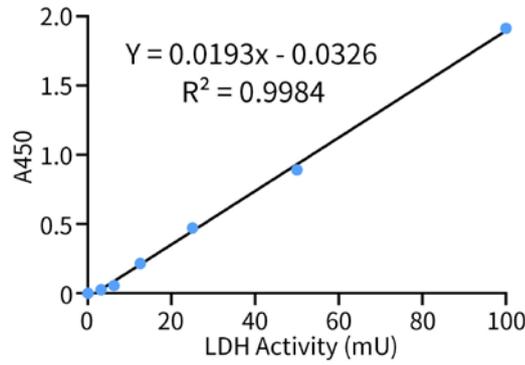


图3. 碧云天乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(WST-8法) (C0018)对LDH标准品的检测结果。实际检测数据会因检测仪器、实验条件等的不同而存在差异, 本图仅供参考。

$A_{450nm} = k \times \text{LDH酶活力单位(mU)} + b$, 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。

检测体系中样品LDH酶活力单位(mU) = (样品组吸光度 - 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

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. 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
C0009S/M	MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒	500/2500次
C0011	台盼蓝染色细胞存活率检测试剂盒	100次
C0013	中性红细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒	500次
C0016/C0017	乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒	100/500次
C0018	乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(WST-8法)	100/500次
C0035/C0036/C0036L	WST-1细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒	100/500/2500次

Version 2024.02.28