

总乳酸脱氢酶检测试剂盒(WST-8法)

产品编号	产品名称	包装
P0395S	总乳酸脱氢酶检测试剂盒(WST-8法)	100次

产品简介:

- 碧云天研发的总乳酸脱氢酶检测试剂盒(WST-8法) (Total Lactate Dehydrogenase Assay Kit with WST-8, 简称Total 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总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⁺依赖型的总乳酸脱氢酶(NAD⁺-dependent total 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]。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]。
- L-乳酸脱氢酶(L-Lactate Dehydrogenase)(NAD⁺ oxidoreductase, EC 1.1.1.27)是一类NAD⁺依赖型同工酶, 催化L-乳酸(L-Lactate)与丙酮酸的相互转化, 同时伴随着NAD⁺至NADH的氧化/还原。有活性的L-乳酸脱氢酶是一种四聚体, 一般由LDHA和LDHB亚基同源或异源组合, 或者由具有精子和睾丸特异性的LDHC亚基同源组合而成[7]。血清L-乳酸脱氢酶是肿瘤学中常规使用的生物标志物, 血清中L-乳酸脱氢酶的正常生理范围为140-245IU/L。高水平的血清L-乳酸脱氢酶与广谱癌症相关, 如胰腺癌、前列腺癌和乳腺癌, 皮肤黑色素瘤等实体瘤及血液恶性肿瘤。血清L-乳酸脱氢酶也被证实与许多癌症的不良预后密切相关, 具有重要的预后价值。此外, 血清L-乳酸脱氢酶含量还被作为抗癌治疗的标志物, 具有预测治疗结果和/或动态监测治疗反应的潜力[8]。
- 本试剂盒的检测原理如图1所示。乳酸脱氢酶催化DL-乳酸(DL-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还原成橙黄色的甲瓊(Formazan), 在450nm左右有最大吸收峰。催化生成的甲瓊的量与总乳酸脱氢酶的活性呈正比, 通过测定450nm处的吸光值最终能计算出样品中总乳酸脱氢酶的活性。

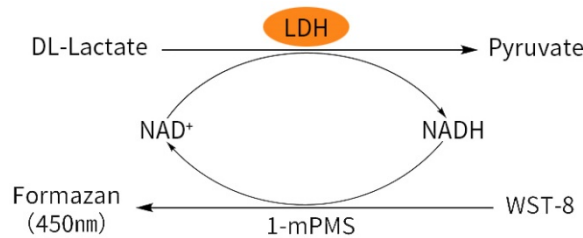


图1. 碧云天总乳酸脱氢酶检测试剂盒(WST-8法) (P0395)的检测原理图。

- 本试剂盒检测灵敏度高, 线性范围宽, 样品用量少。本试剂盒在样品体积为50 μ l时, 可以检测活性低至约0.3mU/ml的总乳酸脱氢酶, 在约0.3-30mU/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反应产物NADH标准品, 可以通过绘制标准曲线(图2A), 计算出样品中的总乳酸脱氢酶的活性。如需特异性检测D-乳酸脱氢酶和L-乳酸脱氢酶的活性, 推荐使用碧云天的D-乳酸脱氢酶检测试剂盒(WST-8法) (P0392)和L-乳酸脱氢酶检测试剂盒(WST-8法) (P0393)。

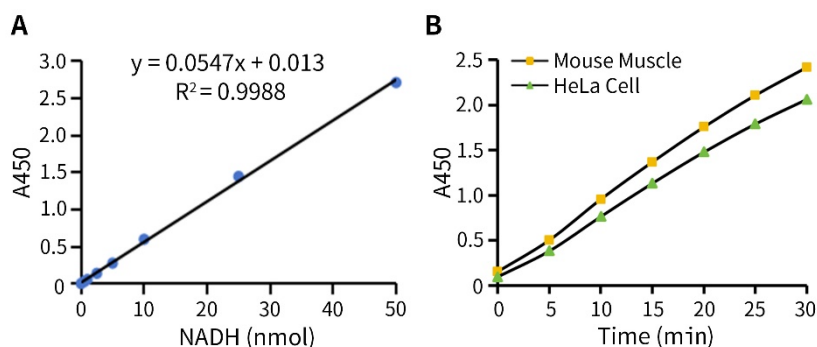


图2. 碧云天总乳酸脱氢酶检测试剂盒(WST-8法) (P0395)对NADH标准品、小鼠肌肉以及HeLa细胞样品的检测效果图。图A为本试剂盒对NADH标准品的检测效果, 在0.5-50nmol范围内有良好的线性关系; 图B为本试剂盒检测蛋白量为0.75μg的小鼠腿肌裂解样品(Mouse Muscle)、蛋白量为2.2μg的HeLa细胞裂解液样品(HeLa Cell)时反应30分钟内的吸光值变化图。实际检测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- **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品的检测, 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
P0395S-1	BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay	20ml
P0395S-2	Total LDH Assay Buffer	20ml
P0395S-3	Substrate	200μl
P0395S-4	DL-Lactate Solution (50X)	200μl
P0395S-5	WST-8	200μl
P0395S-6	NADH	4mg
-	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存, 一年有效。其中WST-8和NADH须避光保存。NADH配制成溶液后, 须适当分装后-80°C保存。

注意事项:

- BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay、Total 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。
- NADH不太稳定, 取出NADH后请尽快使用。如果发现标准曲线不理想, 很有可能是标准品发生了降解。
- 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:

- 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。
- 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:

- 融解BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay、Total 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。
- NADH标准品的配制:** 4mg NADH中加入524μl Total LDH Assay Buffer, 充分溶解, 配制成10mM NADH标准品。10mM NADH标准品请适当分装后-80°C避光保存。
- 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 Total LDH Assay Buffer、2μl Substrate、2μl DL-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
Total LDH Assay Buffer (μl)	44	440	880	2200
Substrate (μl)	2	20	40	100
DL-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L-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DL-Lactate Solution的WST-8显色工作液, 即配制WST-8显色工作液时2μl DL-Lactate Solution用Total LDH Assay Buffer替代。计算时样品孔的读数值需要减去背景对照孔的读数。

3. 样品测定:

a. NADH标准曲线的设置。

取20μl 10mM NADH标准品, 加入180μl Total LDH Assay Buffer, 混匀, 配制成1mM NADH标准溶液。分别取1mM的NADH标准溶液0、0.5、1、2.5、5、10、25、50μl加入96孔板的标准品孔中, 并用Total LDH Assay Buffer补足至50μl, 此时, 标准曲线的浓度和物质的量分别为0、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1mM或0、0.5、1、2.5、5、10、25、50nmol。

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

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, 以确定样品中总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。此处的样品稀释倍数记为n。

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, 反应时间记录为T, 测定A₄₅₀, 记为A₂。吸光值的升高取决于总乳酸脱氢酶的活性, $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

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总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。对于总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。对于总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NADH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乳酸脱氢酶催化产生的NADH量(记为Sa)。NADH标准曲线可以参考图2A, 在0.5-50nmol范围内有良好的线性关系。Total LDH活性计算公式如下:

$$\text{Total LDH Activity (nmol/min/ml or mU/ml)} = Sa \times n / (T \times Sv)$$

注: Sa为步骤3f中根据标准曲线确定的NADH生成量(nmol);

n为步骤3b中样品稀释倍数;

T为步骤3e中的反应时间(min);

Sv为步骤3b中的样品体积(ml)。

总乳酸脱氢酶酶活力单位的定义: 一个酶活力单位(unit, U)在25或37°C, pH7.5的条件下, 在1分钟内可以催化生成1μmol NADH。

示例:

NADH生成量(Sa)=6nmol;

反应时间(T)=30min;

样品体积(Sv)=0.01ml;

样品稀释倍数(n)=2;

Total LDH Activity=6×2/(30×0.01)=40nmol/min/ml, 或40mU/ml。

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.

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.
7. Forkasiewicz A, Dorociak M, Stach K, Szlachowski P, Tabola R, et al. Cell Mol Biol Lett. 2020. 25:35.
8. Claps G, Faouzi S, Quidville V, Chegade F, Shen S, et al. Nat Rev Clin Oncol. 2022. 19(12):749-762.

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

Version 2024.07.31