

乳酸脱氢酶 LDH 活力定量测定试剂盒 E1020

描述: 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 是哺乳动物细胞内糖酵解途径的关键酶, 存在于大多数组织的细胞内液中, 在组织液和细胞外液中的含量很低。例如红细胞中 LDH 的活性比血清中高约 100 倍, 而血液 LDH 的活性是临床诊断和医学研究中常用的生化指标。另一方面, LDH 可从立体培养细胞释放到培养基中, 其释放量可反映细胞经受物理因素或药物处理的损伤程度, 常用来评估组织细胞损伤及药物毒性。培养基 LDH 活性监测与 MTT 或 CCK8 方法是目前两种最常用的细胞增殖-毒性检测方法。

原理: LDH 以氧化型辅酶 I (NAD^+) 作为氢受体, 使乳酸脱氢生成丙酮酸, 丙酮酸与显色剂 (2, 4-二硝基苯肼) 作用生成丙酮酸二硝基苯腙, 其在碱性溶液中呈棕红色, 颜色深浅与丙酮酸浓度成正比, 由此可推算出乳酸脱氢酶的活性。

适用范围: 用于定量测量血清、组织细胞培养基或组织细胞匀浆裂解液中的 LDH 活性, 也常用于评估组织细胞损伤以及药物毒性等。

组成: 试剂 A: 底物缓冲液, 10 ml, 4℃ 避光保存 1 年;
试剂 B: 11.3 mmol/L 氧化型辅酶 I 溶液, 2 ml, -20℃ 保存, 4℃ 可保存 6 周;
试剂 C: 1 mmol/L 2, 4-二硝基苯肼溶液, 10 ml, 4℃ 避光保存半年以上;
丙酮酸钠标准品母液 (5 $\mu\text{mol/ml}$), 0.5 ml, -20℃ 保存;
终止试剂: 0.6 mol/L NaOH, 30 ml, 常温保存。

操作步骤:

一、样本处理:

一) 液体样品处理:

血清用生理盐水作 1: 10 稀释; 脑脊液内乳酸脱氢酶活力较低, 直接以原液测定即可; 其他体液也需 1: 10 稀释后测定。

二) 细胞处理:

细胞用 1% Triton X-100 裂解, 取 10 μl 细胞裂解液用于测定; 细胞培养基可直接用于测定。

二、标准曲线的制作:

临用前, 将丙酮酸钠标准品母液用底物缓冲液稀释成 2.5、2、1.5、1、0.5、0.25、0.125 $\mu\text{mol/ml}$ 7 个浓度, 稀释液 4℃ 可保存一周。丙酮酸钠 0 $\mu\text{mol/ml}$ 的孔只加 10 μl 底物缓冲液, 以此孔作为空白管调零, 按照下述操作步骤进行操作, 而后在 440nm 波长处读取各吸光度, 与其相应的酶活力单位作图, 得出标准曲线。

丙酮酸钠浓度与乳酸脱氢酶活力单位的对应关系

丙酮酸钠浓度 ($\mu\text{mol/ml}$)	0	0.125	0.25	0.5	1	1.5	2	2.5
相当于乳酸脱氢酶活力单位	0	125	250	500	1000	1500	2000	2500

LDH 酶活性测定:

1. 取 10 μl 丙酮酸钠标准品或样本加入到微孔板中。
2. 将试剂 A 与试剂 B 以 5:1 的体积比混合, 取 60 μl 混合液加到各孔, 充分混匀, 37℃ 水浴 15 分钟。
3. 加入 2, 4-二硝基苯肼溶液 50 μl , 与标准品或样本充分混合, 37℃ 水浴 15 分钟。
4. 加入 150 μl 终止试剂, 充分混合。
5. 室温放置 3 分钟后, 440nm 波长处测定。

四、结果处理:

440nm 波长处读取样本孔吸光度, 根据标准曲线计算酶活力单位。

体液:

作 1: 10 稀释后测定的体液实际酶活力单位即是测定的酶活力单位;

未经稀释的体液的酶活力单位=测定的酶活力单位/10;

细胞活力计算:

细胞活力用 LDH 释放率来表示, 后者值越大, 表示细胞活力越差, 受损程度越严重。

细胞 LDH 释放率 (%) = 细胞培养基中测定的酶活力单位 / (细胞裂解液测定的酶活力单位 + 细胞培养基测定的酶活力单位) × 100%

乳酸脱氢酶活力单位定义:

每 100ml 血清中的 LDH 在 37℃ 与底物作用 15 分钟, 能生成一微摩尔丙酮酸者即为一个乳酸脱氢酶活力单位。

以第四管为例, 丙酮酸含量为 0.005 微摩尔, 如稀释后的血清测定结果相当于第四管的光密度时, 因稀释前的血清用量为 0.001ml, 换算成 100ml 时就相当于乳酸脱氢酶活力 500 U / dl;

如果血清未经稀释, 测定结果相当于第四管光密度时, 说明 0.01ml 血清在 37℃ 与基质作用 15 分钟生成 0.005 微摩尔丙酮酸, 换算成 100ml 血清就相当于产生了 50 微摩尔丙酮酸, 乳酸脱氢酶活力单位为 50U/dl, 即测得的酶活力单位除以稀释倍数 10 得实际的酶活力单位。

参考值:

人血清 LDH: 190~310U/dl

注意事项:

1. 红细胞内乳酸脱氢酶活力较血清内约高 100 倍。故标本有轻微的溶血, 测定的结果会比实际的结果高数倍。
2. 草酸盐可抑制乳酸脱氢酶活力, 故不能用草酸盐抗凝血浆测定。
3. 测定结果超过 2500U 时, 应将样本继续稀释后重新测定。
4. 该方法以乳酸盐和 NAD⁺ 为底物, 其优点是乳酸盐及 NAD⁺ 底物液稳定, 冰箱保存时可稳定半年以上, 反应的线性范围较宽。

部分使用普利莱 LDH 活力定量试剂盒发表的 SCI 文章, 供参考:

- 1、Xie F, Jia L, Lin M, et al. ASPP2 attenuates triglycerides to protect against hepatocyte injury by reducing autophagy in a cell and mouse model of non - alcoholic fatty liver disease[J]. Journal of cellular and molecular medicine, 2015, 19(1): 155-164.
- 2、Wu Y, Huang M, Zhao P, et al. Vanadyl acetylacetonate upregulates PPAR γ and adiponectin expression in differentiated rat adipocytes[J]. JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2013, 18(6): 623-631.
- 3、Liu X, Huang H, Liu G, et al. Multidentate zwitterionic chitosan oligosaccharide modified gold nanoparticles: stability, biocompatibility and cell interactions[J]. Nanoscale, 2013, 5(9): 3982-3991.
- 4、Deng J, Liu S, Zou L, et al. Lipolysis response to endoplasmic reticulum stress in adipose cells[J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(9): 6240-6249.
- 5、Zu L, Jiang H, He J, et al. Salicylate blocks lipolytic actions of tumor necrosis factor- α in primary rat adipocytes[J]. Molecular pharmacology, 2008, 73(1): 215-223.