

L-乳酸脱氢酶检测试剂盒(WST-8法)

产品编号	产品名称	包装
P0393S	L-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L-乳酸脱氢酶检测试剂盒(WST-8法) (L-Lactate Dehydrogenase Assay Kit with WST-8, 简称L-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L-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L-乳酸脱氢酶(NAD⁺-dependent L-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]。
- 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[4]。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[5]。
- 本试剂盒的检测原理如图1所示。L-乳酸脱氢酶催化L-乳酸(L-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还原成橙黄色的甲瓩(Formazan), 在450nm左右有最大吸收峰。催化生成的甲瓩的量与L-乳酸脱氢酶的活性呈正比, 通过测定450nm处的吸光值可以非常灵敏地检测样品中L-乳酸脱氢酶的活性。

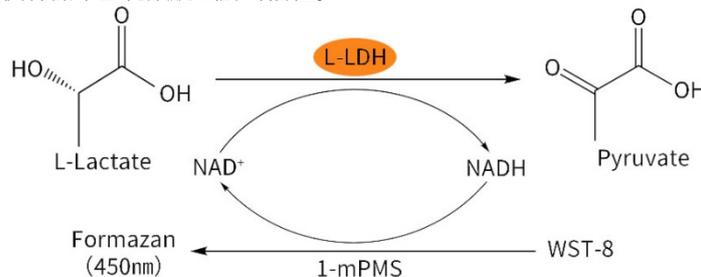


图1. 碧云天L-乳酸脱氢酶检测试剂盒(WST-8法) (P0393)的检测原理图。

- 本试剂盒检测灵敏度高, 线性范围宽, 样品用量少。**本试剂盒能特异性检测L-乳酸脱氢酶, 而不检测D-乳酸脱氢酶。在样品体积为50 μ l时, 可检测活力低至0.3mU/ml的L-乳酸脱氢酶, 在0.3-50mU/ml活力范围内有良好的线性关系。本试剂盒提供了L-乳酸脱氢酶标准溶液, 可以通过绘制标准曲线(图2A), 计算出样品中的L-乳酸脱氢酶的活性。如需检测D-乳酸脱氢酶和总乳酸脱氢酶的活性, 推荐使用碧云天的D-乳酸脱氢酶检测试剂盒(WST-8法) (P0392)和总乳酸脱氢酶检测试剂盒(WST-8法) (P0395)。

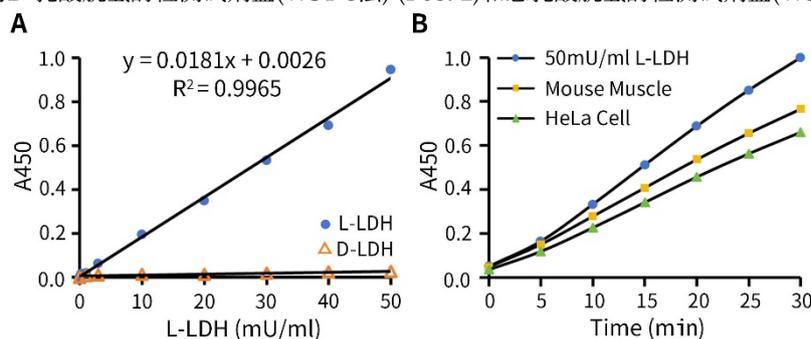


图2. 碧云天L-乳酸脱氢酶检测试剂盒(WST-8法) (P0393)对L-乳酸脱氢酶标准品、小鼠肌肉以及HeLa细胞样品的检测效果图。图A为本试剂盒对L-乳酸脱氢酶标准品的检测效果图,在0.3-50mU/ml范围内有良好的线性关系,并且对于L-乳酸脱氢酶的检测呈现阴性;图B为本试剂盒检测50mU/ml L-乳酸脱氢酶标准品、蛋白量为0.2μg小鼠腿肌裂解样品(Mouse Muscle)、蛋白量为0.5μg HeLa细胞裂解液样品(HeLa Cell)时反应30分钟内的吸光值变化图。实际检测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异,图中数据仅供参考。

- **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
P0393S-1	BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay	20ml
P0393S-2	L-LDH Assay Buffer	20ml
P0393S-3	Substrate	200μl
P0393S-4	L-Lactate Solution (50X)	200μl
P0393S-5	WST-8	200μl
P0393S-6	L-Lactate Dehydrogenase (2.5U/ml)	100μl
-	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存,一年有效。其中WST-8须避光保存。

注意事项:

- 本试剂盒仅能检测L-乳酸脱氢酶,不能检测D-乳酸脱氢酶。
- BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay、L-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。
- 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。
- 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、L-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。
- 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 L-LDH Assay Buffer、2μl Substrate、2μl L-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
L-LDH Assay Buffer (μl)	44	440	880	2200
Substrate (μl)	2	20	40	100
L-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L-Lactate Solution的WST-8显色工作液，即配制WST-8显色工作液时2μl L-Lactate Solution用L-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. L-乳酸脱氢酶标准曲线的设置。

取7μl L-Lactate Dehydrogenase (2.5U/ml)，加入343μl L-LDH Assay Buffer，混匀，配制成为50mU/ml L-乳酸脱氢酶标准溶液。分别取50mU/ml的L-乳酸脱氢酶标准溶液0、0.3、1、3、10、20、30、40、50μl加入96孔板的标准品孔中，并用L-LDH Assay Buffer补足至50μl，此时，标准曲线的浓度分别为0、0.3、1、3、10、20、30、40、50mU/ml。

注：由于酶溶液的用量较少且易沉降，必须注意在使用前先轻轻离心一下，然后适当混匀后再使用。

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

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L-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。样品总稀释倍数记为n（例如本步骤中对样品进行了10倍稀释，加入的‘稀释后的样品’为25μl，则n=10×50/25=20）。

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，测定A₄₅₀，记为A₂。吸光值的升高取决于L-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L-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L-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L-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L-乳酸脱氢酶标准曲线，将 ΔA 代入标准曲线，即可计算出反应时间内样品中L-乳酸脱氢酶的活性B。L-乳酸脱氢酶标准曲线可以参考图2A，在0.3-50mU/ml范围内有良好的线性关系。L-LDH活性计算公式如下：

$$\text{L-LDH Activity (mU/ml)} = B \times n$$

注：B为步骤3f中根据标准曲线确定的L-LDH活性(mU/ml)；

n为步骤3b中样品总稀释倍数。

L-乳酸脱氢酶活力单位的定义：1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丙酮酸。

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. Cristescu ME, Innes DJ, Stillman JH, Crease TJ. BMC Evol Biol. 2008. 8:268.
4. Forkasiewicz A, Dorociak M, Stach K, Szelachowski P, Tabola R, et al. Cell Mol Biol Lett. 2020. 25:35.
5. Claps G, Faouzi S, Quidville V, Chehade 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