

LDH Cytotoxicity Assay Kit

乳酸脱氢酶（LDH）细胞毒性检测试剂盒

产品简介

乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(LDH Cytotoxicity Assay Kit)，也被称为乳酸脱氢酶释放检测试剂盒(LDH Release Assay Kit)，主要用于检测样品中 LDH 含量。

LDH（乳酸脱氢酶）是一种广泛存在于各类生物体中较为稳定的胞浆酶，细胞状态正常时不能通过细胞膜，当细胞受损或死亡时可释放到细胞外。释放到培养基上清中的 LDH 可通过偶联酶反应来定量检测。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⁺和红色的甲臃(Formazan)，甲臃的量与裂解（死亡）细胞的数量成正比，在 490nm 波长下产生吸收峰，因此可通过吸光度检测来判断样品中 LDH 的活性。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。一个试剂盒可进行 500 次检测。

产品规格

货号	C331303E
规格	500 T

组分信息

组分编号	组分名称	产品规格 (500 T)	储存方法
C331303-A	Cell Lysis Buffer 细胞裂解液	7.5 mL	-20°C
C331303-B	Substrate Mix 反应底物	10 mL	-20°C
C331303-C	INT Substrate Solution (10×) INT 溶液 (10×)	1 mL	-20°C避光
C331303-D	INT Dilution Buffer INT 稀释液	10 mL	-20°C
C331303-E	Enzyme Solution 酶溶液	5 mL×2	-20°C，避免反复冻融

储存条件

冰袋运输。-20°C保存，1 年有效。其中酶溶液避免反复冻融，INT 溶液(10×)需避光保存。

注意事项

1. 建议样品准备好后尽量当天完成检测。冷冻会使样品中部分乳酸脱氢酶失活，4°C可放置 2-3 天。
2. 由于血清中含有乳酸脱氢酶，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，在检测时务必设置没有细胞但加入了相同体积培养液的对照孔，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，需自备乳酸脱氢酶标准品。

5. 操作过程中要避免气泡的出现，气泡会影响吸光值读数。
6. 吸取细胞时需温和操作，力度过大会造成自发性 LDH 释放，影响结果。
7. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
8. 本产品仅用于科研。

使用说明

1. 样品准备：

1.1 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，使待测时细胞密度不超 80-90%。
- 2) 吸去培养液，用 PBS 洗涤一次。更换新鲜培养液(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：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 μL 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细胞裂解液，加入量为原有培养液体积的 10%。加入细胞裂解液后，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 400 g 离心 5 min。分别取各孔的上清液 120 μL ，加入到一新的 96 孔板相应孔中，随即进行样品测定。

1.2 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%。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 400 g 离心 5 min。尽量吸除上清，加入 150 μL 用 PBS 稀释 10 倍的试剂盒提供的细胞裂解液(10 体积 PBS 中加入 1 体积细胞裂解液并混匀)，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 400 g 离心 5 min。分别取各孔的上清液 120 μL ，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%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 5 min。尽量吸除上清，加入 150 μL 用 PBS 稀释了 10 倍的试剂盒提供的细胞裂解液(10 体积 PBS 中加入 1 体积细胞裂解液并混匀)，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 400 g 离心 5 min。分别取各孔上清液 120 μL ，加入到一新的 96 孔板相应孔中，随即进行样品测定。

【注】：LDH 释放检测更为常用，细胞内总 LDH 检测通常可以用 MTT、WST-1 或 CCK-8 等方法替代。

2. 试剂盒的准备工作：

- 1) INT 溶液(1×)的配置：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 20 μL INT 溶液(10×)，加入 180 μL INT 稀释液，混匀后即为 200 μL 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 检测工作液的配制：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】：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
反应底物	20 μL	200 μL	400 μL	1 mL
INT 溶液(1×)	20 μL	200 μL	400 μL	1 mL
酶溶液	20 μL	200 μL	400 μL	1 mL
总体积	60 μL	600 μL	1.2 mL	3 mL

- 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 10 mU/mL、5 mU/mL、2.5 mU/mL、1.25 mU/mL、0.65 mU/mL、0 mU/mL。

3. 样品测定：

- 1) 各孔分别加入 60 μL LDH 检测工作液。
- 2) 混匀，室温(约 25℃) 避光孵育 30 min(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 490 nm 处测定吸光度。可使用 600 nm 或大于 600 nm 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)

$$\text{细胞毒性或死亡率(\%)} = (\text{处理样品吸光度} - \text{样品对照孔吸光度}) / (\text{细胞最大酶活性的吸光度} - \text{样品对照孔吸光度}) \times 100$$
- 4) 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。

【附 1 LDH 酶活性的相对定量】：

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 OD₄₉₀ - 背景空白对照孔 OD₄₉₀) / (标准管 OD₄₉₀ - 标准空白管 OD₄₉₀) × 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 2 LDH 酶活性的绝对定量】：

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 OD_{490} - 背景空白对照孔 OD_{490}

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