

LDH Cytotoxicity Assay Kit

Cat No. 40209

产品说明书

本产品仅作科研用途!

产品信息

产品名称	货号	规格
LDH Cytotoxicity Assay Kit 乳酸脱氢酶 (LDH) 细胞毒性检测试剂盒	40209ES76	500 T

产品描述

乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(LDH Cytotoxicity Assay Kit), 也称乳酸脱氢酶检测试剂盒(LDH Assay Kit)或乳酸脱氢酶释放检测试剂盒(LDH Release Assay Kit), 是一种基于 Diaphorase 催化 INT 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活性或检测其它样品中的乳酸脱氢酶活性的试剂盒。

检测原理: LDH (乳酸脱氢酶) 在胞浆内含量丰富, 正常时不能通过细胞膜, 当细胞受损伤或死亡时可释放到细胞外, 释放出的 LDH 在培养基上清中, 可通过酶反应来检测。在乳酸脱氢酶的作用下, NAD^+ 被还原生成 NADH, NADH 和 INT (a tetrazolium salt) 被硫辛酰胺脱氢酶(Diaphorase)催化反应生成 NAD^+ 和红色的甲臃(Formazan), 甲臃的量与裂解的细胞数成正比, 在 490 nm 波长下产生吸收峰, 从而可以通过比色来定量乳酸脱氢酶的活性。吸光度与乳酸脱氢酶活性成线性正相关。

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, 而 LDH 释放显然是一种更为安全有效的替代方法。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和细胞毒性检测。

本试剂盒可检测细胞培养液、细胞裂解液等样品中乳酸脱氢酶的活性。一个试剂盒可进行 500 次检测。

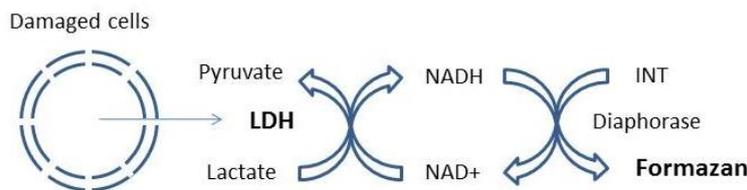


图 LDH 检测试剂盒原理示意图

产品组分

组分编号	组分名称	产品规格 (500 T)	储存方法
40209-A	Cell Lysis Buffer 细胞裂解液	7.5 mL	-20℃
40209-B	Substrate Mix 反应底物	10 mL	-20℃
40209-C	INT Substrate Solution (10×) INT 溶液 (10×)	1 mL	-20℃ 避光
40209-D	INT Dilution Buffer INT 稀释液	10 mL	-20℃
40209-E	Enzyme Solution 酶溶液	5 mL×2	-20℃, 避免反复冻融

保存条件

冰袋运输。-20℃ 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测定。冷冻会使样品中部分乳酸脱氢酶失活, 4℃ 可放置 2-3 天。
- 2) 由于血清含有乳酸脱氢酶, 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。
- 3) 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。
- 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) 操作过程中避免气泡的出现, 气泡会影响吸光值读数。
- 6) 吸取细胞时避免需温和操作, 力度过大会造成自发性 LDH 释放, 影响读数。
- 7) 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. 样品准备:

(一) 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, 使待检测时细胞密度不超过 80-90%。
- ② 吸去培养液, 用 PBS 液洗涤一次。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), 继续按常规培养。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。

(二) 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 400 g 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 释放检测更加常用一些, 细胞内总 LDH 检测通常可以使用 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 \times)的配置:** 根据所需的 INT 溶液(1 \times)的量, 取适量 INT 溶液(10 \times)用 INT 稀释液稀释至 1 \times 。例如, 取 20 μL INT 溶液(10 \times), 加入 180 μL INT 稀释液, 混匀后即为 200 μL INT 溶液(1 \times)。INT 溶液(1 \times)宜现配现用, 配置后 4 $^{\circ}\text{C}$ 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 \times)	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 10mU/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 $^{\circ}\text{C}$) 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。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)
细胞毒性或死亡率(%)=(处理样品吸光度-样品对照孔吸光度)/(细胞最大酶活性的吸光度-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(OD₄₉₀) = 样品孔 OD₄₉₀ - 背景空白对照孔 OD₄₉₀

检测体系中 LDH 酶活力单位(mU) = (OD₄₉₀ - 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