



LDH 细胞毒性检测试剂盒

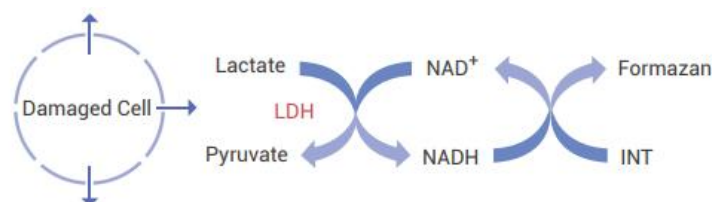
包装清单

Cat No.	组分	包装规格-500T
MCK-0008	Working Solution (工作液)	27.5mL
	Stop Solution (终止液)	27.5mL
	Lysis Solution (裂解液)	5.5mL
	说明书	1 份

产品简介

细胞死亡或膜损伤造成的细胞膜完整性丧失会导致胞浆内酶的释放, 通过检测释放到培养液中的酶的活性可测定细胞毒性。乳酸脱氢酶 (LDH) 是细胞毒性研究中使用最广泛的标志物之一, 其存在于所有细胞类型中, 并在在质膜受损后迅速释放到培养上清中。

LDH 细胞毒性检测试剂盒是通过分析释放到培养上清液中的 LDH 活性而测定细胞损伤的试剂盒。配合使用 CCK-8 可获得死细胞、活细胞数据。在 LDH 的作用下, 乳酸 (Lactate) 被氧化为丙酮酸 (Pyruvate), NAD^+ 被还原成 NADH, NADH 和 INT 反应生成橙黄色的甲臍 (Formazan)。甲臍的最大吸光度值位于 490 nm 处, 且吸光度与 LDH 活性呈线性正相关。利用此原理可以测定死细胞和受损细胞的数量。检测原理如下图:



本试剂盒对细胞无害, 可直接添加到含有细胞的培养基中, 一步检测培养上清中的 LDH 活性 (直接法), 也可以分离细胞后吸取培养上清进行检测 (间接法), 分离的细胞可用于其他实验。

保存条件

-20°C 避光保存, 有效期 1 年。

注意事项

- 96 孔板的选择: 直接法中贴壁细胞和悬浮细胞都使用平底 96 孔板; 间接法中贴壁细胞使用平底 96 孔板, 悬浮细胞使用圆底或 V 底 96 孔板。
- 加入 Working Solution 后, 吸光度与反应时间成正比, 建议 0-30 min 内检测。由于不同细胞差异较大, 建议首次实验时, 分别测定 0 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min 时的吸光度, 以便确定最佳反应时间。
- 使用 96 孔板进行检测时, 如果细胞培养时间较长, 一定要注意蒸发问题。一方面, 由于 96 孔板周围一圈最容易蒸发, 可以采取弃用周围一圈的办法, 改加相同量的 PBS、水或培养液; 另一方面, 可以把 96 孔板置于靠近培养箱内水源的地方, 以缓解蒸发。
- 用酶标仪检测前需确保每孔内没有气泡, 否则会干扰测定。
- 建议采用多通道移液器, 以减小平行孔间的差异。
- 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背景空白 (仅含培养基), 以用于消除背景。
- 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等因素, 都会造成细胞释放乳酸脱氢酶增加。
- 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。
- 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. 用前须知

对照设置:

- 高对照: 含细胞、培养基, 每孔加 10 μL Lysis Solution; 用于测定细胞的最大可释放 LDH。
- 高对照空白: 含培养基, 每孔加 10 μL Lysis Solution; 用于扣除高对照本底吸光度值。



- (3) 低对照：含细胞、培养基，不做裂解处理；用于测定未经处理的正常细胞的自发 LDH 释放。
- (4) 背景空白：含培养基；用于扣除低对照及样品孔本底吸光度值。

	样品	高对照	高对照空白	低对照	背景空白
培养基	/	/	100 μ L	10 μ L	110 μ L
细胞	100 μ L	100 μ L	/	100 μ L	/
药物	10 μ L	/	/	/	/
Lysis Solution	/	10 μ L	10 μ L	/	/

2. 预实验—确定 LDH 细胞毒性测定的最佳细胞数

- (1) 先用细胞计数板计数所制备的细胞悬液中的细胞数量，然后接种细胞。
- (2) 按比例依次用培养基等比稀释成一个细胞浓度梯度，一般要做 5-7 个细胞浓度梯度，每组 4-6 个复孔。
- (3) 接种后培养 2-4 h 使细胞贴壁。
- (4) 在高对照孔和高对照空白孔中加入 10 μ L Lysis Solution，在低对照孔中加入 10 μ L 培养基，37°C CO₂ 培养箱内培养 30 min。
- (5) **直接法**：每孔吸掉 50 μ L 培养基上清，以剩余培养基及细胞作为检测对象，向每孔中加入 50 μ L Working Solution，震荡混匀。
- 间接法**：从每孔中吸取 50 μ L 上清液至新的 96 孔板中。而后在新的 96 孔板每孔中加入 50 μ L Working Solution，震荡混匀。

注：直接法适用于不需要收集活细胞进行其它实验，间接法适用于需要收集活细胞进行其它实验。根据实验目的选择其中一种方法测定 LDH 活性。

- (6) 室温避光孵育 30 min。
- (7) 在每孔加入 50 μ L Stop Solution 后，立即用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度。

注：根据如下要求选择最佳的细胞浓度：①高对照孔和低对照孔的 OD 值之差 > 0.2；②在线性曲线上的该细胞浓度的 OD 值 < 2.0。

3. 细胞毒性检测

- (1) 在 96 孔板中接种细胞悬液（100 μ L/孔，10⁴-10⁵），将培养板放在培养箱中预培养 24 h。
- (2) 向培养板加入不同浓度的待测药物。
- (3) 将培养板在培养箱孵育适当时间（例如 6、12、24 或 48 h）。
- (4) 在高对照孔和高对照空白孔中加入 10 μ L Lysis Solution，在低对照孔中加入 10 μ L 培养基，37°C CO₂ 培养箱内培养 30 min。
- (5) **直接法**：每孔吸掉 50 μ L 培养基上清，以剩余培养基及细胞作为检测对象，向每孔中加入 50 μ L Working Solution，震荡混匀。
- 间接法**：从每孔中吸取 50 μ L 上清液至新的 96 孔板中。而后在新的 96 孔板每孔中加入 50 μ L Working Solution，震荡混匀。

注：直接法适用于不需要收集活细胞进行其它实验，间接法适用于需要收集活细胞进行其它实验。根据实验目的选择其中一种方法测定 LDH 活性。

- (6) 室温避光孵育 30 min。
- (7) 在每孔加入 50 μ L Stop Solution 后，立即用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度。

注：配合使用 CCK-8 可获得死细胞和活细胞数据。

4. 数据处理

细胞毒性 Cytotoxicity (%) = $\frac{(X-Z)}{(Y-Z)} \times 100\%$

其中 X：样品孔吸光度值-背景空白孔吸光度值

Y：高对照孔吸光度值-高对照空白孔吸光度值

Z：低对照孔吸光度值-背景空白孔吸光度值