

## LDH 细胞毒性检测试剂盒

### Cytotoxicity LDH Assay Kit

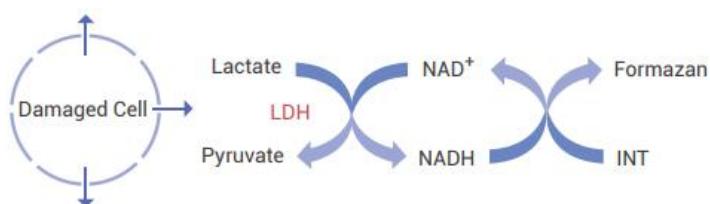
#### 包装清单

Cat No.	组分	包装规格-100T	包装规格-500T
MCK-0008	Working Solution (工作液)	5.5 mL	27.5mL
	Stop Solution (终止液)	5.5 mL	27.5mL
	Lysis Solution (裂解液)	1.1 mL	5.5mL
	说明书	1 份	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，并能在质膜受损后迅速释放到培养上清液中。

默科的 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。在 LDH 的作用下，乳酸（Lactate）被氧化为丙酮酸（Pyruvate），NAD<sup>+</sup>被还原成 NADH，NADH 和 INT 反应生成橙黄色的甲臜（Formazan）。甲臜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，有效期一年。

#### 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 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，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. 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。
- 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。
- 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 $\mu$ L	10 $\mu$ L	110 $\mu$ L
细胞	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	/	100 $\mu$ L	/
药物	10 $\mu$ L	/	/	/	/
Lysis Solution	/	10 $\mu$ L	10 $\mu$ 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  $\mu$ L Lysis Solution, 在低对照孔中加入 10  $\mu$ L 培养基, 37°C CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 30 min。
  - (5) **直接法:** 每孔吸掉 50  $\mu$ 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  $\mu$ L Working Solution, 震荡混匀。  
**间接法:** 从每孔中吸取 50  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ L/孔, 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup>), 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  $\mu$ L Lysis Solution, 在低对照孔中加入 10  $\mu$ L 培养基, 37°C CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 30 min。
  - (5) **直接法:** 每孔吸掉 50  $\mu$ 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  $\mu$ L Working Solution, 震荡混匀。  
**间接法:** 从每孔中吸取 50  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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

$$\text{细胞毒性 Cytotoxicity (\%)} = [(X-Z)/(Y-Z)] \times 100\%$$

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