



LDH Cytotoxicity Assay Kit

产品信息

1. 产品别称

LDH 细胞毒性检测试剂盒、LDH Release Assay Kit。

2. 产品介绍

细胞毒性 (Cytotoxicity) 是细胞受到化学物质或其他细胞作用而引起的死亡事件, 它是不依赖于凋亡或坏死的细胞死亡。细胞毒性有多种检测方法, 其中比较经典的是放射性的 ⁵¹Cr 释放法, 而 LDH 释放是一种更为安全有效的替代方法。LDH 可用酶反应来检测, 具体原理是: LDH 催化乳酸还原为丙酮酸, 同时 NAD⁺ 被还原为 NADH, 而 NADH 又可以和 INT 反应生成红色的甲臃和 NAD⁺, 甲臃的量与 LDH 活性呈正比, 利用甲臃在 490nm 波长处有吸收峰, 可以定量 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 1000 个样品检测。

3. 应用范围

细胞介导的细胞毒性检测、细胞毒性检测、细胞总数检测。

4. 产品优势

- (1) 使用简便, 无需提前构建特殊细胞系。
- (2) 灵敏度高, 对早期和低水平细胞毒性均可检测。
- (3) 反应快, 颜色变化明显, 反应终点易判断。
- (4) 试验结果重复性高。
- (5) 悬浮和贴壁细胞都可使用。

5. 产品组分及 LDH 底物配制

产品组分列表:

组分名称	编号	体积	储存条件
Lysis solution	CA22018-1	5ml	2°C 至 8°C
Stop solution	CA22018-2	65ml	2°C 至 8°C
Solution A	CA22018-3	0.75ml	-30°C 至 -10°C
Solution B	CA22018-4	30ml	-30°C 至 -10°C
Solution C	CA22018-5	30ml	-30°C 至 -10°C

LDH 底物溶液的配制: 将 Solution A, Solution B 和 Solution C 融化, 按下表取相应体积配制约 5ml 底物溶液, 颠倒混匀并避光放置。LDH 底物溶液现用现配效果最佳, 避免反复冻融, 检测后剩余底物溶液应尽快放回 -30°C 至 -10°C 保存。各反应液用后应尽快放回 -30°C 至 -10°C 保存。

	Solution A	Solution B	Solution C
体积	62.5 μl	2.5ml	2.5ml

6. 运输

蓝冰运输。

使用方法

1. 细胞介导的细胞毒性检测

1) 在圆底 96 孔板上设置: 靶细胞自发对照、靶细胞最大裂解对照、效应细胞自发对照, 以及靶细胞和效应细胞共孵育的试验组。每个对照和试验组可分别设置 3 个重复孔, 每孔终体积相同, 终体积可选择 100 μl 或 200 μl, 以下以 200 μl 为例进行说明。

2) 准备适宜浓度的靶细胞和效应悬液, 靶细胞和效应细胞离心去除各自原来的培养基, 用相同的培养基重悬。

3) 按 1) 中 96 孔板设置, 依次加入相应溶液 (靶细胞自发孔: 加入 100 μl 靶细胞, 并补充 100 μl 培养基, 该孔用于检测靶细胞自发释放 LDH; 靶细胞最大裂解孔: 加入 100 μl 靶细胞, 并补充 100 μl 培养基, 在收获上清前, 加入 20 μl Lysis solution, 37°C 孵育 45 分钟, 保证靶细胞完全裂解; 效应细胞自发孔: 加入 100 μl 效应细胞, 并补充 100 μl 培养基, 用于排除效应细胞自身释放 LDH 的干扰。

4) 细胞铺好后, 将 96 孔板 200g 离心 2 分钟, 保证效应细胞和靶细胞充分接触。

5) 将 96 孔板转入 37°C 培养箱孵育 (孵育时间由具体实验决定)。



6) 到达预定孵育时间前 45 分钟, 在靶细胞最大裂解孔中加入 20 μ l Lysis solution。

7) 达到孵育时间后, 将 96 孔板 200g 离心 2 分钟。

8) 从所有孔中吸取 50 μ l 上清, 转入新的平底 96 孔板。

9) 向上清液中加入 50 μ l LDH 底物溶液, 室温暗处孵育 30 分钟 (培养孔会逐渐变红)。

10) 向每孔加入 50 μ l Stop solution。

11) 用针头扎破气泡, 在 490nm 波长下检测每孔的吸收值 (在加入终止液一小时内完成检测)。

12) 计算杀伤率。杀伤率 (%) = $\frac{[(\text{试验}-\text{效应细胞自发}) - (\text{靶细胞自发})]}{(\text{靶细胞最大裂解}-\text{靶细胞自发})} \times 100$ 。

2. 细胞毒性检测

1) 在圆底 96 孔板上设置对照孔和试验孔, 包括: 靶细胞最大裂解孔、含靶细胞及测试药物的试验孔、靶细胞自发孔 (加入与试验孔等体积的药物溶剂), 分别用 100 μ l 培养基重悬。

2) 到达预定孵育时间前 45 分钟, 向最大裂解孔加入 10 μ l Lysis solution, 37°C 反应 45 分钟。

3) 从所有试验孔和对照孔吸取 50 μ l 上清, 转入新的平底 96 孔板。向转移出来的上清中再加入 50 μ l LDH 底物溶液, 室温暗处孵育 30 分钟 (培养孔会逐渐变红)。

4) 再向每孔加入 50 μ l Stop solution。

5) 用针头扎破气泡, 在 490nm 波长下检测吸收值。

6) 计算杀伤率。杀伤率 (%) = $\frac{[(\text{试验}-\text{靶细胞自发})]}{(\text{靶细胞最大裂解}-\text{靶细胞自发})} \times 100$ 。

3. 细胞总数检测

1) 准备一系列数目已知的细胞, 及数目待测的细胞, 分别用 100 μ l 培养基重悬, 后转入圆底 96 孔板, 并设置等体积培养基空白对照孔。

2) 向所有孔加入 10 μ l Lysis solution, 37°C 孵育 45 分钟。

3) 将 96 孔板 200g 离心 2 分钟, 从所有孔吸取 50 μ l 上清, 转入新的平底 96 孔板。

4) 向所有上清中加入 50 μ l LDH 底物溶液, 室温暗处孵育 30 分钟 (培养孔会逐渐变红)。

5) 再向所有孔加入 50 μ l Stop solution。

6) 用针头刺破所有大气泡, 即可在 490nm 波长下检测每孔吸收值。

7) 计算。用所有试验孔吸收值减去培养基空白对照吸收值, 即实际吸收值。以细胞数目为 X, 吸收值为 Y, 建立 Y 关于 X 的线性关系, 根据公式, 即可计算出相应吸收值对应的细胞数目。

注意事项:

1) 培养基中的酚红和血清都会产生 LDH, 因此有必要在预实验中检测培养基对照的 OD490 吸收值。

2) 培养基可以选择无酚红培养基, 血清浓度可以降低至 1%。

3) 保证实验用细胞处于最佳状态, 避免自发过大。

4) 杀伤率比较小时, 可以通过延长细胞孵育时间, 扩

5) 大效应细胞比例等措施改善。

6) 490nm 和 492nm 波长都可用于检测。

7) 吸收值太高, 超出酶标仪检测范围时, 相应地缩短上清液与 LDH 底物的反应时间。

8) 悬浮细胞、免疫细胞推荐用圆底 96 孔板做细胞杀伤试验。