

## 乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒

货号：PMK0863

保存：-20℃保存 6 个月

规格：100T

适用样本：细胞

### 产品简介：

乳酸脱氢酶（LDH）是一种氧化还原酶（EC1.1.1.27），广泛存在于各种生物体中。它催化丙酮酸和乳酸相互转化，同时伴随着 NADH 和 NAD<sup>+</sup>的相互转化。细胞凋亡或坏死而造成的细胞膜结构的破坏会导致细胞浆内的酶释放到培养液里，其中包括酶活性较为稳定的乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)。通过检测从质膜破裂的细胞中释放到培养液中的 LDH 的活性，就可以实现对细胞毒性的定量分析。LDH 释放被看做细胞膜完整性的重要指标，并被广泛用于细胞毒性检测。LDH 释放被认为是以前使用放射性的 <sup>51</sup>Cr 标记细胞，随后通过 <sup>51</sup>Cr 释放进行细胞膜完整性检测的安全有效的替代方法。本试剂盒为研究细胞毒性提供了一种简便的比色测定法，其原理是基于在典型的细胞毒性测定中，将靶细胞与细胞毒性化学试剂或细胞毒性细胞（NK 细胞，细胞毒性 T 细胞）一起培养，以诱导靶细胞死亡和 LDH 释放。将含有 LDH 的上清液转移至新的 96 孔测定板的孔中，在乳酸脱氢酶的作用下，NAD<sup>+</sup>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<sup>+</sup>和强生色物甲臞(formazan)，在 490nm 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。本试剂盒可以用于细胞毒性检测也可用于常规的乳酸脱氢酶活性的检测。

### 产品内容

试剂盒组分	规格	储存条件
	100T	
反应缓冲液	10mL	4℃
乳酸溶液	1mL	4℃
INT 溶液（10×）	0.2mL	-20℃，避光保存
NAD <sup>+</sup> 溶液	1mL	-20℃
Diaphorase 溶液	120μL	-20℃
LDH 阳性对照	120μL	-20℃
LDH 释放试剂	1.5mL	4℃

### 自备耗材

酶标仪（能测 490nm 处的吸光度）及二氧化碳培养箱  
 96 孔板，透明平底  
 平板离心机（可选）  
 可调节式移液枪及枪头  
 去离子水

### 试剂准备

**注意：**各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。

反应缓冲液：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

乳酸溶液：即用型；整个实验过程中，冰上放置；4℃保存。

## 产品说明书

**INT 溶液：**使用前配制，根据所需的 INT 溶液的量，取适量 INT 溶液（10×）用反应缓冲液稀释至 1×。例如，取 20 μL INT 溶液（10×），加入 180 μL 反应缓冲液，混匀后即得 200 μL INT 溶液。现配现用，配置后 4℃ 保存，可于当天使用。

**Diaphorase 溶液：**即用型；整个实验过程中，冰上避光放置；-20℃，避光保存。

**LDH 阳性对照：**即用型；整个实验过程中，冰上放置；保存于-20℃。

**LDH 释放试剂：**即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 保存。

**工作液配制：**每孔配制 100 μL 工作液，现配现用。吸取 61 μL 反应缓冲液，20 μL INT 溶液，8 μL NAD<sup>+</sup> 溶液，1 μL Diaphorase 溶液和 10 μL 乳酸溶液混匀。

### 实验步骤

#### I 确定药物是否适用该试剂盒

个别药物可能会干扰反应体系，故不适用于该试剂盒，因此，我们建议执行初始预实验，以确定计划使用的目标药物是否适用于该试剂盒，如果预实验显示药物有抑制作用，联系我们。

1. 培养细胞 24h 以上，离心除去颗粒，得到细胞培养上清。
2. 将细胞培养上清加入到 96 孔细胞培养板中，200 μL/孔，设置 6 个复孔。
3. 在 3 个孔中加入 20 μL 目标药物，另外 3 孔加入 20 μL 反应缓冲液作为对照孔。
4. 每孔各取 100 μL 转移到新的 96 孔检测板中。
5. 每孔加入 100 μL 工作液，将板在 37℃ 下孵育 30min。
6. 用酶标仪读取 490nm 处的吸光度。
7. 评估加药孔与对照孔的吸光度，若加药孔明显小于对照孔，说明该药物不适用于该试剂盒。

#### II 样本测定

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 200 μL 培养基中，使待检测时细胞密度不超过 80-90%。
2. 从 96 孔板中吸出生长培养基。用 PBS 洗涤细胞一次，然后将生长培养基替换为含 1% 血清的低血清培养基或适当的无血清培养基，再孵育 1h。
3. 将 200 μL 1% 血清培养基或无血清培养基（无细胞）添加至三个孔作为背景对照和三个孔作为 LDH 阳性对照（可选做）。
4. 通过所需方法诱导细胞毒性，向适当的含有细胞的孔一式三份添加 20 μL 目标药物，可设置不同浓度，不同处理时间。
5. 将 20 μL 的 LDH 释放试剂添加到三个含有细胞的孔中作为最大释放，将 20 μL 反应缓冲液添加到三个含有细胞的孔中作为自发释放。同时将 20 μL 反应缓冲液添加到三个只含培养基无细胞的孔中作为背景对照。将 20 μL LDH 阳性对照添加到三个只含培养基无细胞的孔中作为阳性对照（可选做）。
6. 在 37℃ 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育平板，使其达到实验所需的诱导细胞毒性的时间。
7. 以 400g 的速度离心 96 孔组织培养板 5min（可选做，但建议做）。
8. 将 100 μL 细胞上清液转移至新的 96 孔测定板中。
9. 每孔加入 100 μL 工作液，将板在 37℃ 下孵育 30min。
10. 用酶标仪读取 490nm 处的吸光度。从所有孔中减去背景的平均吸光度  $A_{\text{背景}}$ ，计算  $\Delta A_{\text{样本}} = A_{\text{样本}} - A_{\text{背景}}$ 、 $\Delta A_{\text{自发}} = A_{\text{自发}} - A_{\text{背景}}$ 、 $\Delta A_{\text{最大释放}} = A_{\text{最大释放}} - A_{\text{背景}}$ 。

**注意：**加入药物浓度应是反应体系的终浓度。每个实验的结果计算为“细胞毒性百分比”，或靶细胞中所含 LDH 总量的百分比。因此，对于每个实验，必须有一组对照孔，其中使用试剂盒中提供的 LDH 释放试剂杀死所有靶细胞。这些就是“最大释放”。同样，在每个实验中，必须有一组对照孔，其中未添加细胞毒性剂或细胞毒性细胞，从而导致最低的（自发的）LDH 释放，就是“自发释放”细胞孔。用细胞毒剂处理的细胞将释放一定数量的 LDH，该数量介于最大释放水平和自发释放水平之间。

### 结果计算

以下公式计算为“细胞毒性百分比”：

$$\text{细胞毒性百分比 (\%)} = (\Delta A_{\text{样本}} - \Delta A_{\text{自发}}) / (\Delta A_{\text{最大释放}} - \Delta A_{\text{自发}}) \times 100$$

### 注意事项

1. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
2. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
3. 不同批次号、不同的厂家的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。

## 产品说明书

4. 混合或复溶组分时，避免产生气泡。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。
6. 实验开始前，确保所有的组分及设备处于合适的温度。
7. 保持好的实验习惯，穿戴好手套、实验服、口罩、防目镜等防护工具后再开始实验。

### 相关产品：

PMK0854 增强型 CCK-8 试剂盒

PMK0988 Annexin V-AbFluor™ 488 细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）

PMK0997 一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）

PMK0992 EdU-488 法细胞增殖成像检测试剂盒



更多产品详情了解，请关注公众号：