

# 乳酸脱氢酶（LDH）细胞毒性检测试剂盒

产品编号：MA0649

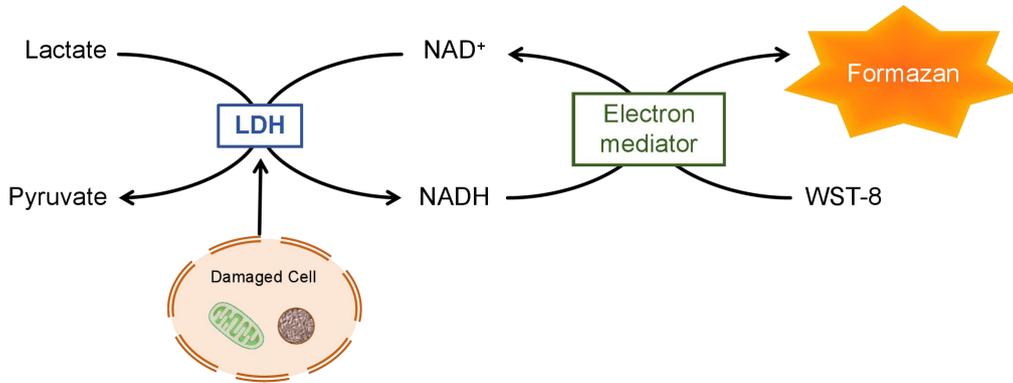
规格：100T / 500T

## 产品内容

产品组成	MA0649-1 100T	MA0649-2 500T
Lysis Buffer	1.1 mL	5.5 mL
Catalyst Solution	1.1 mL	5.5 mL
Dye Solution	9.9 mL	49.5 mL
Stop Solution	5.5 mL	27.5 mL
说明书	1 份	1 份

## 产品简介

乳酸脱氢酶（LDH）细胞毒性检测试剂盒（LDH Cytotoxicity Assay Kit）是一种基于WST-8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（Lactate dehydrogenase, LDH）活性或检测其它样品中的LDH活性的试剂盒。本试剂盒的基本原理如下：LDH是绝大部分哺乳动物活细胞中都存在的酶，受损细胞所释放出的LDH催化乳酸（Lactate）生成丙酮酸（Pyruvate），并伴随着NAD<sup>+</sup>到NADH的转化。NADH通过电子载体可将水溶性四唑盐WST-8还原成水溶性的橙色甲贍产物（Formazan），在490nm波长下产生吸收峰，甲贍产物的吸光度与LDH的量呈正相关，利用此原理可以测定死细胞和受损细胞的数量。该酶联反应原理的示意图如下。



本试剂盒所采用的WST-8法跟经典的INT法相比，检测反应迅速、灵敏度更高，吸光度变化更大，检测结果更准确。可以用于常规的LDH活性的检测，尤其适用于以LDH释放为指标的细胞毒性/损伤检测。同时，基于细胞裂解后LDH活性的检测，本试剂盒也可以用于检测细胞增殖。本试剂盒搭配CCK-8（MA0218/MA0225）检测，可作为细胞毒性双指标认证，更适合Car-T、ADCC、CDC等效靶杀伤实验。

本试剂盒中试剂不会和活细胞反应，而且对细胞无损害，可以直接添加到含有细胞的培养基中检测（一步法），也可以取细胞上清检测（低损伤法，分离的细胞可以做其他实验）。



## 操作步骤

### ➤ 实验前准备

#### 1. 分组

	样品	样品 Blank	高对照	高对照 Blank	低对照	背景 Blank
培养基		√	√	√	√	√
细胞悬液	√		√		√	
药物	√	√				
Lysis Buffer			√	√		

【注】培养基中动物血清中的LDH会增加背景吸收，建议设置一个Blank组对照来校正。

#### 2. 方法的选择

方法1：一步法，无需离心，更便捷，适用于不需要收集活细胞进行其它实验的LDH检测。

方法2：低损伤法，适用于需要收集活细胞进行其它实验的LDH检测。

#### 3. 96孔板的准备

一步法：贴壁细胞和悬浮细胞都使用平底96孔板。

低损伤法：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。

#### 4. 配制LDH检测工作液

按照1:9的体积比例将Catalyst Solution和Dye Solution均匀混合即配制成LDH检测工作液。按照每孔100 $\mu$ L的体积，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LDH检测工作液。

	1 孔	10 孔	20 孔	50 孔
Catalyst Solution	10 $\mu$ L	0.1mL	0.2mL	0.5mL
Dye Solution	90 $\mu$ L	0.9mL	1.8mL	4.5mL

【注】LDH检测工作液必须现配现用，短期可于-20 $^{\circ}$ C或2-8 $^{\circ}$ C保存2-3天。配制和使用过程中均要注意适当避光。

### ➤ 制作LDH标准曲线（可选）

如果需要进行LDH的绝对定量，需自备不同浓度的LDH标准品（如0、65、125、250、500、1000 mU/mL）。如有必要，在后续实验中可以根据样品的LDH活性，对标准曲线的浓度范围进行适当调整。

### ➤ 检测方法1：一步法

#### （一）预实验—细胞数最佳化（可选）

因为每种细胞的LDH量不同，推荐通过预实验确定高对照和低对照的吸光度差异最大的细胞数。

1. 制备细胞悬液，细胞计数，调整细胞密度至 $5 \times 10^5$  cells/mL。

2. 向96孔板中每孔加入100  $\mu$ L培养基。

3. 如图1所示向2列中加入100 $\mu$ L细胞悬液，按1/2比例向右依次和培养基混合等比稀释成一系列细胞浓度梯度（推荐使用多通道移液器进行操作），并准备高对照Blank和背景Blank，每组3个复孔。



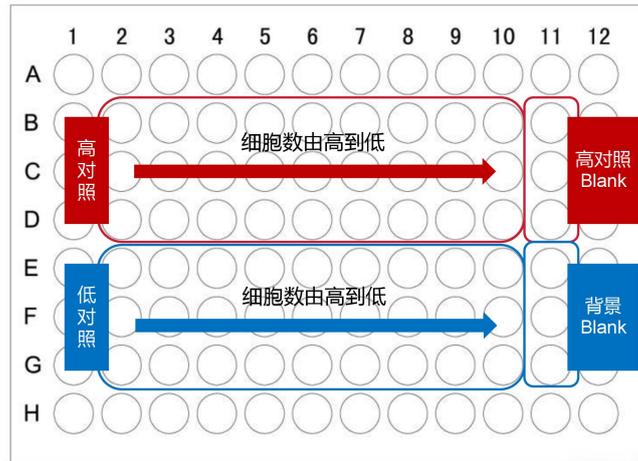


图 1. 预实验 96 孔板分组设置示意图

4. 在细胞培养箱中培养一定时间，此时间设定应与之后的细胞毒性时间一致。
5. 在高对照孔中加入10 $\mu$ L Lysis Buffer，在低对照孔和背景Blank孔中加入10 $\mu$ L培养基。
6. 在细胞培养箱中培养30 min。
7. 在每孔中加入100 $\mu$ L检测工作液，采用包裹铝箔等方法避光，在室温反应，吸光度与反应时间成正比，建议5-30 min内检测。

【注】因为不同细胞差异较大，建议首次实验时每隔五分钟测定一次吸光度，以确定最佳反应时间。

8. 在每孔中加入50  $\mu$ L Stop Solution后，立刻用酶标仪测定490 nm的吸光度。
9. 以吸光度为X轴，细胞密度为Y轴绘制线性曲线，根据以下要求选择最佳的细胞浓度：（1）高对照和低对照的吸光度之差 $>0.2$ ；（2）在线性曲线上的该细胞浓度的吸光度 $<2.0$ 。

## （二）细胞毒性检测

1. 将最适细胞数的待检细胞加入到96孔板中，每孔50 $\mu$ L。
2. 贴壁细胞培养过夜，换液后继续进行步骤3；悬浮细胞可以在适当静置后继续进行步骤3。
3. 加入50 $\mu$ L含有药物的培养基（如表1）。
4. 在细胞培养箱中培养合适的时间。
5. 在高对照孔中加入10  $\mu$ L Lysis Buffer后，在样品、样品Blank、低对照孔和背景Blank孔中加入10  $\mu$ L培养基，在细胞培养箱内培养30 min。
6. 在每个孔中加入100 $\mu$ L 检测工作液后，在室温的条件下避光孵育。培养时间设定与预实验一致，若没有做预实验，可以在5-30 min每隔5 min观察颜色，当各组橙黄色差异明显时即可。
7. 在每孔中加入50  $\mu$ L Stop Solution后，立刻用酶标仪测定490 nm的吸光度。

表1. 细胞毒性试验各分组每孔溶液量（一步法）

	样品	样品 Blank	高对照	高对照 Blank	低对照	背景 Blank
培养基	10 $\mu$ L	60 $\mu$ L	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L	60 $\mu$ L	110 $\mu$ L
细胞悬液	50 $\mu$ L		50 $\mu$ L		50 $\mu$ L	
药物	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L				
Lysis Buffer			10 $\mu$ L	10 $\mu$ L		



## ➤ 检测方法2：低损伤法

### （一）预实验—细胞数最佳化（可选）

因为每种细胞的LDH量不同，推荐通过预实验确定高对照和低对照的吸光度差异最大的细胞数。

1. 制备细胞悬液，细胞计数，调整细胞密度至 $5 \times 10^5$  cells/mL。
2. 向96孔板中每孔加入100  $\mu$ L培养基。
3. 如图1所示向2列中加入100 $\mu$ L细胞悬液，按1/2比例向右依次和培养基混合等比稀释成一系列细胞浓度梯度（推荐使用多通道移液器进行操作），并准备高对照Blank和背景Blank（只有培养基），每组3个复孔。

4. 在每孔中加入100  $\mu$ L培养基。
5. 在细胞培养箱中培养一定时间，此时间设定应与之后的细胞毒性时间一致。
6. 在高对照孔中加入20 $\mu$ L Lysis Buffer，在低对照孔和背景Blank孔中加入20 $\mu$ L培养基。
7. 在细胞培养箱中培养30 min。
8. 96孔板250 $\times$ g离心2 min，使悬浮细胞沉淀。
9. 从每个孔中吸取100 $\mu$ L上清液至新的96孔板中。

【注】请小心吸取上清液，避免吸出细胞。

10. 在每孔中加入100 $\mu$ L检测工作液，采用包裹铝箔等方法避光，在室温反应，吸光度与反应时间成正比，建议5-30 min内检测。

【注】因为不同细胞差异较大，建议首次实验时每隔五分钟测定一次吸光度，以确定最佳反应时间。

11. 在每孔中加入50  $\mu$ L Stop Solution后，立刻用酶标仪测定490 nm的吸光度。
12. 以吸光度为X轴，细胞密度为Y轴绘制线性曲线，根据以下要求选择最佳的细胞浓度：（1）高对照和低对照的吸光度之差 $>0.2$ ；（2）在线性曲线上的该细胞浓度的吸光度 $<2.0$ 。

### （二）细胞毒性检测

1. 将最适细胞数的待检细胞加入到96孔板中，每孔100 $\mu$ L。
2. 贴壁细胞培养过夜，换液后继续进行步骤3；悬浮细胞可以在适当静置后继续进行步骤3。
3. 加入100 $\mu$ L含有药物的培养基（如表2）。
4. 在细胞培养箱中培养合适的时间。
5. 在高对照孔中加入20  $\mu$ L Lysis Buffer后，在样品、样品Blank、低对照孔和背景Blank孔中加入20  $\mu$ L培养基，在细胞培养箱内培养30 min。

6. 96孔板250 $\times$ g离心2 min，使悬浮细胞沉淀。
7. 从每个孔中吸取100 $\mu$ L上清液至新的96孔板中。

【注】请小心吸取上清液，避免吸出细胞。

8. 在每个孔中加入100 $\mu$ L检测工作液后，在室温的条件下避光孵育。培养时间设定与预实验一致，若没有做预实验，可以在5-30 min每隔5 min观察颜色，当各组橙黄色差异明显时即可。
9. 在每孔中加入50  $\mu$ L Stop Solution后，立刻用酶标仪测定490 nm的吸光度。



表2. 细胞毒性试验各分组每孔溶液量（低损伤法）

	样品	样品 Blank	高对照	高对照 Blank	低对照	背景 Blank
培养基	20 $\mu$ L	120 $\mu$ L	100 $\mu$ L	200 $\mu$ L	120 $\mu$ L	220 $\mu$ L
细胞悬液	100 $\mu$ L		100 $\mu$ L		100 $\mu$ L	
药物	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L				
Lysis Buffer			20 $\mu$ L	20 $\mu$ L		

### ➤ 数据整理与计算公式

1. 计算“样品孔-样品Blank孔”、“高对照孔-高对照Blank孔”、“低对照孔-背景Blank孔”的吸光度，算出n=3的平均值。

$$2. \text{细胞损伤率} = [(A-C) / (B-C)] \times 100\%$$

A: 样品的平均吸光度“样品孔-样品Blank孔”

B: 高对照的平均吸光度“高对照孔-高对照Blank孔”

C: 低对照的平均吸光度“低对照孔-背景Blank孔”

### 保存条件

-20℃避光保存，自生产之日起12个月有效。建议将试剂分装保存，避免反复冻融导致产品失效，干扰实验测定。试剂盒解冻后可以短期于2-8℃保存，3天内有效。

### 注意事项

1. 动物血清中的LDH活性较高时，可以通过降低血清浓度来减小其中的LDH造成的背景吸收，一般有两种解决方法：①将血清浓度降低到5%会显著减小背景而不影响细胞活力。不推荐用1% BSA来代替血清检测细胞介导的细胞毒性。②使用灭活血清，这样血清中的LDH背景会大幅度下降。
2. 待检样品准备好后建议当天完成测定，如果暂时无法测定，则请置于2-8℃，可放置2-3天。不建议置于-20℃，会使样品中部分LDH失活。
3. 细胞过度生长、密度过高、状态不佳、离心速度过大、培养箱内外温差过大，都会造成细胞释放LDH增加。不同种类、不同状态的细胞LDH的含量也存在一定差异。
4. 未加终止液时，随着时间延长，吸光度会逐渐增大。加入终止液后，显色可以避光稳定保存48小时。
5. 如果酶标仪没有490nm滤光片，也可以使用450nm滤光片，吸光度会高于490nm。
6. CCK-8以细胞活性为指标，本试剂盒以游离的LDH为指标，两种指标检测存在差异性，二者联用，能更全面的表征细胞毒性。
7. 如果待测体系中存在氧化还原物质则可能会干扰检测结果，还原性物质会使吸光度增加，氧化性物质会使吸光度减小，因此应设法去除这些物质的影响。
8. 当在培养箱内培养时，培养板最外一圈的孔最容易干燥挥发，由于体积不准确而增加误差。一般情况下，最外一圈的孔只加培养基，不作为测定孔用。
9. 为了您的安全和健康，操作时请穿着实验服并佩戴一次性手套。

Y240501

