

## 乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒

### LDH Cytotoxicity Assay Kit

#### 产品信息

产品名称	编号	规格
乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒	DY80212	500T

#### 产品描述

乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(LDH Cytotoxicity Assay Kit), 是一种基于 diaphorase 催化的 INT 显色反应, 通过比色法检测细胞毒性时释放的乳酸脱氢酶活性或检测其它样品中的乳酸脱氢酶活性的试剂盒。本试剂盒可以用于常规的乳酸脱氢酶活性的检测, 也常用于以 LDH 释放为指标的细胞毒性检测。同时, 基于细胞总乳酸脱氢酶活性的检测, 本试剂盒也可以用于检测细胞增殖和细胞毒性检测。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。通过检测释放到培养液中的 LDH 的活性, 就可以实现对细胞毒性的定量分析。

本试剂盒的基本原理是, 在乳酸脱氢酶的作用下,  $NAD^+$  被还原生成 NADH, NADH 和 INT 被硫辛酰胺脱氢酶(diaphorase) 催化反应生  $NAD^+$  和强生色物甲臞, 在 490nm 波长下产生吸收峰, 从而通过比色来定量检测细胞培养液、细胞裂解液等样品中乳酸脱氢酶的活性。

#### 产品组成

产品组分名称	规格
乳酸溶液	10ml
酶溶液	5ml×2
INT 溶液(10×)	1ml
INT 稀释液	10ml

#### 保存方式

-20°C 避光 1 年

#### 操作说明

##### 1. 样品的准备

方法一: LDH 释放检测

- 根据细胞的大小和生长速度将适量细胞接种到 96 孔细胞培养板中, 使待检测时细胞密度不超过 80-90%。
- 吸去培养液, 用 PBS 液洗涤一次。换新鲜培养液(推荐使用含 1%血清的低血清培养液或适当的无血清培养液), 将各培养孔分成如下几组: 包括无细胞的培养液孔(背景空白对照孔), 未经药物处理的对照细胞孔(样品对照孔), 未经药物处理的用于后续裂解的细胞孔(样品最大酶活性对照孔), 以及药物处理的细胞孔(药物处理样品孔), 并做好标记。按照实验需要给予适当药物处理(如加入 0-10 $\mu$ l 左右特定的药物刺激, 可设置不同浓度, 不同处理时间, 对照孔中需加入适

当的药物溶剂对照), 继续按常规培养。到预定的检测时间点前 1 小时, 从细胞培养箱里取出细胞培养板, 在样品最大酶活性对照孔中加入试剂盒提供的 LDH 释放试剂, 加入量为原有培养液体积的 10%。加入 LDH 释放试剂后, 反复吹打数次混匀, 然后继续在细胞培养箱中孵育。

3) 到达预定时间后, 将细胞培养板用多孔板离心机 400g 离心 5min。分别取各孔的上清液 120 $\mu$ l, 加入到一新的 96 孔板相应孔中, 随即进行样品测定。

#### 方法二: 细胞内总 LDH 的检测

1) 细胞毒性检测: 根据细胞的大小和生长速度将适量细胞接种到 96 孔细胞培养孔板中, 使待检测时细胞密度不超过 80-90% 满。加入不同药物进行处理, 并设置适当对照。药物刺激完毕后, 将细胞培养板用多孔板离心机 400g 离心 5min。尽量吸除上清, 加入 150 $\mu$ l 用 PBS 稀释了 10 倍的试剂盒提供的 LDH 释放试剂(10 体积 PBS 中加入 1 体积 LDH 释放试剂并混匀), 适当摇晃培养板混匀, 然后继续在细胞培养箱中孵育 1 小时。随后将细胞培养板用多孔板离心机 400g 离心 5min。分别取各孔的上清液 120 $\mu$ l, 加入到一新的 96 孔板相应孔中, 随即进行样品测定。

2) 细胞增殖检测: 根据细胞的大小和生长速度将适量细胞接种到 96 孔细胞培养孔板中, 使促进细胞增殖的药物刺激后细胞不超过 80-90% 满为宜。使用不同的药物刺激细胞, 并设置适当对照。药物刺激完毕后, 将细胞培养板用多孔板离心机 400g 离心 5min。尽量吸除上清, 加入 150 $\mu$ l 用 PBS 稀释了 10 倍的试剂盒提供的 LDH 释放试剂(10 体积 PBS 中加入 1 体积 LDH 释放试剂并混匀), 适当摇晃混匀胞, 然后继续在细培养箱中孵育 1 小时。随后将细胞培养板用多孔板离心机 400g 离心 5min。分别取各孔上清液 120 $\mu$ l, 加入到一新的 96 孔板相应孔中, 随即进行样品测定。

注: LDH 释放检测更加常用一些, 细胞内总 LDH 检测通常可以使用 MTT、WST-1 或 CCK-8 等方法替代。

## 2. 试剂盒的准备工作

1) INT 溶液(1 $\times$ )的配置: 根据所需的 INT 溶液(1 $\times$ )的量, 取适量 INT 溶液(10 $\times$ )用 INT 稀释液稀释至 1 $\times$ 。例如, 取 20 $\mu$ l INT 溶液(10 $\times$ ), 加入 180 $\mu$ l INT 稀释液, 混匀后即配置为 200 $\mu$ l INT 溶液(1 $\times$ )。INT 溶液(1 $\times$ )宜现配现用, 配置后 4 $^{\circ}$ C 保存可于当天使用, 不宜配置后冻存。

2) LDH 检测工作液的配制: 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检测工作液。

注意: LDH 检测工作液必须现配现用, 配制和使用过程中均要注意适当避光。

检测次数	1 次	10 次	20 次	50 次
乳酸溶液	20 $\mu$ l	200 $\mu$ l	400 $\mu$ l	1ml
INT 溶液(1 $\times$ )	20 $\mu$ l	200 $\mu$ l	400 $\mu$ l	1ml
酶溶液	20 $\mu$ l	200 $\mu$ l	400 $\mu$ l	1ml
总体积	60 $\mu$ l	600 $\mu$ l	1.2ml	3ml

3) (选做)如果希望进行 LDH 酶活性的绝对定量, 需自备 LDH 标准品, 并新鲜配制不同浓度 LDH 标准品, 如 10mU/ml、5mU/ml、2.5mU/ml、1.25mU/ml、0.65mU/ml、0 mU/ml。

## 3. 样品测定

1) 各孔分别加入 60 $\mu$ l LDH 检测工作液。

2) 混匀, 室温(约 25 $^{\circ}$ C) 避光孵育 30min(可用铝箔包裹后置于水平摇床或侧摆摇床上缓慢摇动)。然后在 490nm 处测定吸光度。使用 600nm 或大于 600nm 的任一波长作为参考波长进行双波长测定。

3) 计算(测得的各组吸光度均应减去背景空白对照孔吸光度)

4) 细胞毒性或死亡率(%)=(处理样品吸光度 - 样品对照孔吸光度) / (细胞最大酶活性的吸光度 - 样品对照孔吸光度)  $\times$  100

5) 可绘制细胞毒性曲线: 纵坐标为实际吸光度, 横坐标为药物浓度; 据此可计算该药物作用特定时间的半致死剂量 LD50。

### 注意事项

1. 冷冻会使样品中部分乳酸脱氢酶失活, 4 $^{\circ}$ C 可放置 2-3 天。建议样品准备好后尽量当天完成测定。

2. 如果检测细胞培养液中的乳酸脱氢酶, 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没有细胞，但加入了相同体积培养液的对照孔，以用于消除背景。

3. 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，都会造成细胞释放乳酸脱氢酶增加。
4. 如果希望进行乳酸脱氢酶活性的绝对定量，用户需自备乳酸脱氢酶标准品。

本产品仅作科研用途