

使用说明书

Instruction Manual

细胞毒性乳酸脱氢酶 (LDH) 检测试剂盒

LDH Cytotoxicity Assay Kit

产品描述

乳酸脱氢酶 (Lactate Dehydrogenase, LDH) 是一种广泛存在于细胞质中的胞内酶, 参与糖酵解过程中乳酸与丙酮酸之间的可逆转化。当质膜受损时, LDH 迅速释放到细胞培养上清液中, 这是细胞发生凋亡、坏死和其他形式细胞损伤的关键特征。因此, 上清中 LDH 的活性水平可作为评估细胞膜完整性和细胞毒性的重要生物标志物, 广泛应用于药物毒理、细胞活力、免疫细胞杀伤等研究。

本试剂盒基于 LDH 催化乳酸 (Lactate) 转化为丙酮酸 (Pyruvate), 并伴随 NAD^+ 还原为 NADH 的反应, 随后 NADH 进一步与 INT 反应生成橙红色化合物甲臞 (formazan)。甲臞在 490 nm 处有较高的吸光值, 并与 LDH 活性呈正比。因此通过测定吸光度, 即可定量检测 LDH 活性, 从而间接反映细胞损伤或凋亡程度。

产品信息

500 T 规格的产品组成如下:

产品编号	产品名称	产品包装
C0058-1	Lysis Solution	5 mL
C0058-2	Substrate Solution	25 mL
C0058-3	Dye Solution	250 μL
C0058-4	Stop Solution	25 mL

产品特点

- 高灵敏度和高线性范围: 适用于多种细胞系和不同毒性强度的处理条件。
- 非放射性、无毒显色法: 安全环保, 适合常规实验室环境使用。
- 兼容高通量筛选: 可用于 96 孔或 384 孔板, 适合自动化平台。
- 可定量或相对比较: 适用于药物筛选、杀伤细胞活性分析等多种实验需求。

产品应用

- 细胞毒性检测: 用于评估药物、化合物或处理条件对细胞的毒性作用 (细胞膜完整性损伤)。
- 细胞凋亡与坏死分析: 通过检测胞外 LDH 释放, 反映细胞死亡过程中的膜通透性变化。
- 免疫细胞杀伤实验: 评价 NK 细胞、T 细胞等对靶细胞的杀伤活性 (如 ADCC、CTL 实验)。
- 肿瘤细胞代谢与损伤研究: 作为肿瘤细胞增殖活性、坏死状态的间接指标, 用于药效研究。

操作说明

1. 预实验：LDH 细胞毒性试验的细胞数优化

由于不同的细胞类型含有不同量的 LDH，因此需要通过预实验确定最佳细胞数。

1) 制备连续稀释的细胞液，吸取 100 μ L 于 96 孔板，每种密度设置两组三个复孔。

注：a) A 组用于最大 LDH 活性检测，B 组用于自发 LDH 活性检测。b) 最大细胞密度是根据预铺板结果而定，加入 Lysis Solution 之前最大细胞密度孔的细胞密度约为 80-90%。

2) 贴壁细胞需在 37°C 培养箱过夜培养，待细胞贴壁；悬浮细胞种板后即可进行检测。

3) 向 A 组最大 LDH 活性稀释系列的三复孔中加入 10 μ L Lysis Solution，轻轻混合均匀。向 B 组自发 LDH 活性稀释系列的三复孔中加入 10 μ L 培养基，轻轻混合均匀。

注：移液时不要产生气泡，因为气泡会影响准确的吸光度读数。

4) 37°C 培养箱孵育 30 min。

5) 将 Substrate Solution 和 Dye Solution 以 100:1 的比例混合，配制成 Working Solution。例如取 1 mL Substrate Solution 与 10 μ L Dye Solution，混合均匀配成 1.01 mL Working Solution，可用于 20 个孔的检测。

注：Working Solution 不稳定，需要现配现用，配制和使用过程中均要注意避光。

6) 将 50 μ L 上清液转移到 96 孔平底酶标板上。

7) 向每孔中加入 50 μ L Working Solution，轻轻混合均匀。室温下避光孵育 20-40 min。

8) 向每个样品孔加入 50 μ L Stop Solution，轻轻混合均匀。确保溶液中无气泡，立即检测 490 nm 和 680 nm 处的吸光度。从主波长测量值 (490 nm) 中减去背景吸光度 (680 nm)。

9) 绘制最大 LDH 活性吸光度值、自发 LDH 活性吸光度值与细胞数的关系图，以确定 LDH 细胞毒性测定的线性范围和最佳细胞数。对于目标细胞的浓度，其最大 LDH 活性吸光度值应小于 2.0，且最大 LDH 活性吸光度值-自发 LDH 活性吸光度值应大于 0.2。

2. 细胞毒性实验

1) 组别设置

	化合物处理	最大 LDH 活性	最大 LDH 活性对照	自发 LDH 活性	培养基对照
细胞 (μ L)	100	100	-	100	-
培养基 (μ L)	-	-	100	10	110
化合物 (μ L)	10	-	-	-	-
Lysis Solution (μ L)	-	10	10	-	-

2) 在 96 孔板中接种细胞悬液，100 μ L/孔，三复孔，最佳细胞数由预实验确定。

3) 贴壁细胞需在 37°C 培养箱过夜培养，待细胞贴壁；悬浮细胞种板后即可进行检测。

4) 孵育过夜后，进行如下处理：向自发 LDH 活性一组三复孔细胞中加入 10 μ L 培养基；向化合物处理 LDH 活性三复孔细胞中加入 10 μ L 不同浓度的化合物；最大 LDH 活性不做处理。

5) 37°C 培养箱孵育适当时间。

6) 向最大 LDH 活性对照的三重孔中加入 10 μ L Lysis Solution，轻轻混合均匀。

注：移液时不要产生气泡，因为气泡会影响准确的吸光度读数。

7) 37°C 培养箱孵育 30 min。

8) 将 Substrate Solution 和 Dye Solution 以 100:1 的比例混合，配制成 Working Solution。例如取 1 mL Substrate Solution 与 10 μ L Dye Solution，混合均匀配成 1.01 mL Working Solution，可用于 20 个孔的检测。

注：Working Solution 不稳定，需要现配现用，配制和使用过程中均要注意避光。

9) 每个样品取 50 μ L 的上清液转移到 96 孔平底酶标板上，一式三孔。

10) 向每孔中加入 50 μ L Working Solution，轻轻混合均匀。室温下避光孵育 20-40 min。

11) 向每个样品孔加入 50 μ L Stop Solution，轻轻混合均匀。确保溶液中无气泡，立即检测 490 nm 和 680 nm 处的吸光度。从主波长测量值 (490 nm) 中减去背景吸光度 (680 nm)。

12) 使用以下公式计算细胞毒性百分比

$$\text{细胞毒性 (\%)} = (A-B) / (C-B) * 100\%$$

A=化合物处理吸光度-培养基对照吸光度

B=自发 LDH 活性吸光度-培养基对照吸光度

C=最大 LDH 活性吸光度-最大 LDH 活性对照吸光度

储存条件

-20℃保存一年。

注意事项

1. 样品冷冻保存可能导致部分乳酸脱氢酶 (LDH) 失活, 建议 4℃短期保存 (2-3 天), 样品尽量在当天检测完成。
2. 加入 Working Solution 后, 反应时间越长, 吸光值通常越高。不同细胞的 LDH 活性不一样, 若信号值上升慢, 可以适当增加孵育时间, 但最好不要超过 1 h, 孵育时间过长, 信号会出现下降的情况。
3. 在使用 96 孔板进行长时间培养时, 应特别注意液体蒸发问题, 最外圈孔不宜放置细胞。
4. 在用酶标仪读取前, 应确保各孔内无气泡存在, 否则可能会影响吸光度的准确性。
5. 建议使用多道移液器进行加样, 以减少孔间误差, 提高重复性和准确性。
6. 因血清中含有乳酸脱氢酶, 推荐使用浓度不超过 1%, 并优选热灭活处理的血清。建议设置培养基对照孔 (无细胞, 仅加等量培养基) 以校正背景信号。
7. 若细胞密度过高、生长时间过长, 或离心力过大、培养环境温差显著等, 均可能引发 LDH 释放增加, 需在实验设计中加以控制。
8. 若需进行 LDH 活性绝对定量, 用户需自备 LDH 标准品。
9. 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。
10. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

