

Product Data Sheet

Product Name: Cytotoxicity LDH Assay Kit
 Cat. No.: GK10003

产品组成

Components	100T	500T
Working Solution	5.5 mL	27.5 mL
Stop Solution	5.5 mL	27.5 mL
Lysis Solution	1.1 mL	5.5 mL

功能属性

应用: 已用于在细胞培养基中对乳酸脱氢酶(LDH)的活性进行测定。
 已用于确定样本中乳酸脱氢酶的浓度。
 运输方式: 蓝冰运输。
 储存条件: 储存于-20°C避光, 可稳定长达12个月。
 用途: 仅供研究使用!不能用于人体。

实验参考方法

一. 对照设置

高对照: 含细胞、培养基, 每孔加10 μ L Lysis Solution, 用于测定细胞的最大可释放LDH。
 高对照空白: 含培养基, 每孔加10 μ L Lysis Solution, 用于扣除高对照本底吸光度值。
 低对照: 含细胞、培养基, 不做裂解处理; 用于测定未经处理的正常细胞的自发LDH释放。
 背景空白: 含培养基; 用于扣除低对照及样品孔本底吸光度值。

	样品	高对照	高对照空白	低对照	背景空白
培养基	---	---	100 μ L	10 μ L	110 μ L
细胞	100 μ L	100 μ L	---	100 μ L	---
药物	10 μ L	---	---	---	---
裂解液	---	10 μ L	10 μ L	---	---

表1: 组别设置

二. 使用方法

1. 预实验(细胞数的最佳化)

1) 用培养基洗涤细胞后, 制成 5×10^5 cells/ml的细胞悬液。
 2) 向96孔板中每孔加入100 μ L培养基。
 3) 如图1所示, 向96孔板中A行 (高对照和低对照各3个孔) 加入100 μ L细胞悬液后, 用多通道移液器按1/2比例用培养基稀释成一个系列细胞梯度。

Caution: Product has not been fully validated for medical applications. For research use only.

Tel: (626) 353-8530 Fax: (626) 353-8530 E-mail: tech@glpbio.com

Address: 10292 Central Ave. #205, Montclair, CA, USA

Product Data Sheet

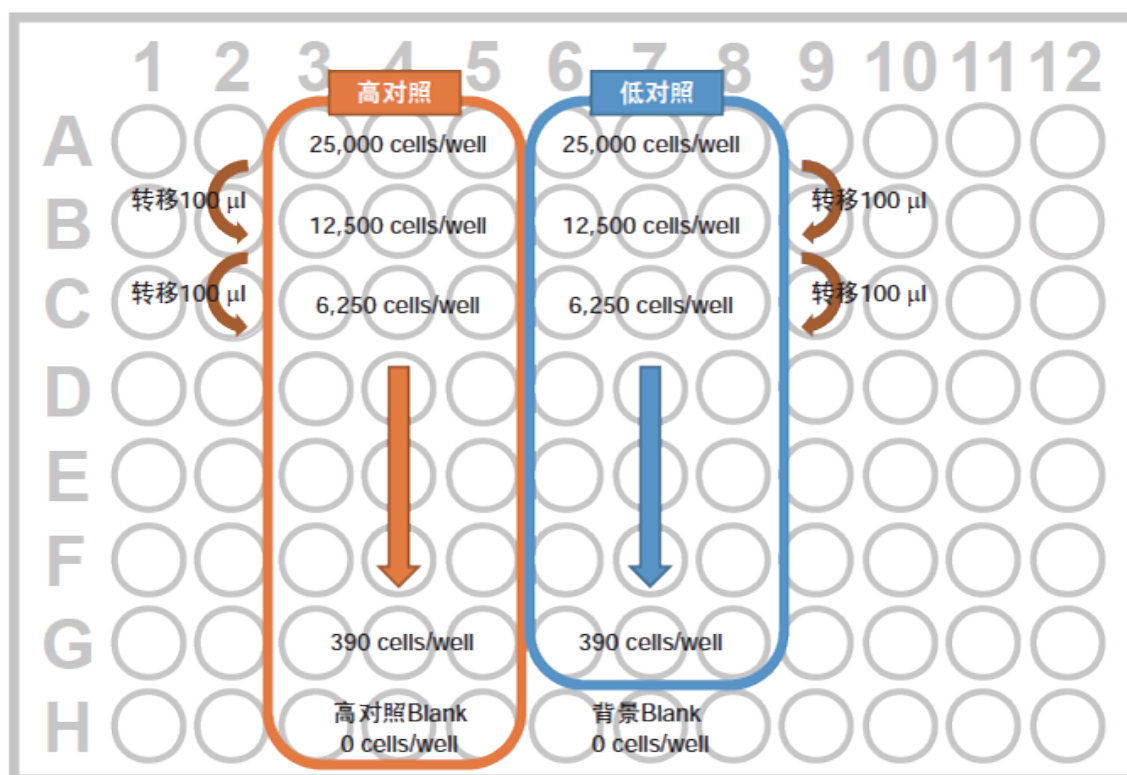


图1: 预实验96孔板细胞梯度配制例

另外，准备高对照空白(培养基+ Lysis Solution)和背景空白 (只有培养基) 各3个孔。

4)在37°C CO₂培养箱中培养。

* 培养时间设定与细胞毒性实验在37°C CO₂培养箱内培养合适的时间一致。

5)在高对照孔和高对照空白孔中加入10 µL Lysis Solution，在低对照孔和背景空白孔中加入10 µL培养基。

6)在37°C CO₂培养箱中培养30 min。

7)直接法：每孔吸掉50 µL 培养基上清，以剩余培养基及细胞作为检测对象，向每孔中加入 50 µL Working Solution，震荡混匀。

间接法：从每孔中吸取50 µL 上清液至新的96孔板中。而后在新的96孔板每孔中加入 50 µL Working Solution，震荡混匀。

* 为了避免吸出细胞，请小心吸取上清液。

* 直接法适用于不需要收集活细胞进行其它实验，间接法适用于需要收集活细胞进行其它实验。根据实验目的选择其中一种方法测定LDH活性。

8)采用包裹铝箔等方法避光，在室温孵育。

* 加入Working Solution后，吸光度与反应时间成正比，建议0-30 min内检测。

* 由于不同细胞差异较大，建议首次实验时，分别测定0 min，5 min，10 min，20 min，30 min时的吸光度，以便确定最佳反应时间。

9) 在每孔中加入50 µL Stop Solution后，立刻用酶标仪测定490nm的吸光度。

* 以吸光度为X轴，细胞浓度为Y轴绘图，根据下面的要求选择最佳的细胞浓度：

-高对照和低对照的O.D.值之差>0.2;

-在线性曲线上的该细胞浓度的O.D.值<2.0。

2. 细胞毒性检测

1) 在96孔板中接种细胞悬液 (100 µL/孔)，将培养板放在培养箱中预培养24h。

Caution: Product has not been fully validated for medical applications. For research use only.

Tel: (626) 353-8530 Fax: (626) 353-8530 E-mail: tech@glpbio.com

Address: 10292 Central Ave. #205, Montclair, CA, USA

Product Data Sheet

- 2) 向培养板加入不同浓度的待测药物。
- 3) 将培养板在培养箱孵育适当时间。
- 4) 在高对照孔和高对照空白孔中加入10 μ L Lysis Solution, 在低对照孔中加入10 μ L 培养基, 37°C CO₂培养箱内培养30 min。
- 5) 直接法: 每孔吸掉50 μ L 培养基上清, 以剩余培养基及细胞作为检测对象, 向每孔中加入50 μ L Working Solution, 震荡混匀。
间接法: 从每孔中吸取50 μ L 上清液至新的96孔板中。而后在新的96孔板每孔中加入 50 μ L Working Solution, 震荡混匀。
* 直接法适用于不需要收集活细胞进行其它实验, 间接法适用于需要收集活细胞进行其它实验。根据实验目的选择其中一种方法测定 LDH活性。
- 6) 室温避光孵育。
* 培养时间与预实验的一致。
- 7) 在每孔加入50 μ L Stop Solution 后, 立即用酶标仪测定490nm处的吸光度。
* 配合使用 CCK-8 (GK10001)可获得死细胞和活细胞数据。

3. 数据处理

$$\text{Cytotoxicity}(\%) = [(X-Z)/(Y-Z)] \times 100\%$$

其中 X: 样品孔吸光度值-背景空白孔吸光度值

Y: 高对照孔吸光度值-高对照空白孔吸光度值

Z: 低对照孔吸光度值-背景空白孔吸光度值

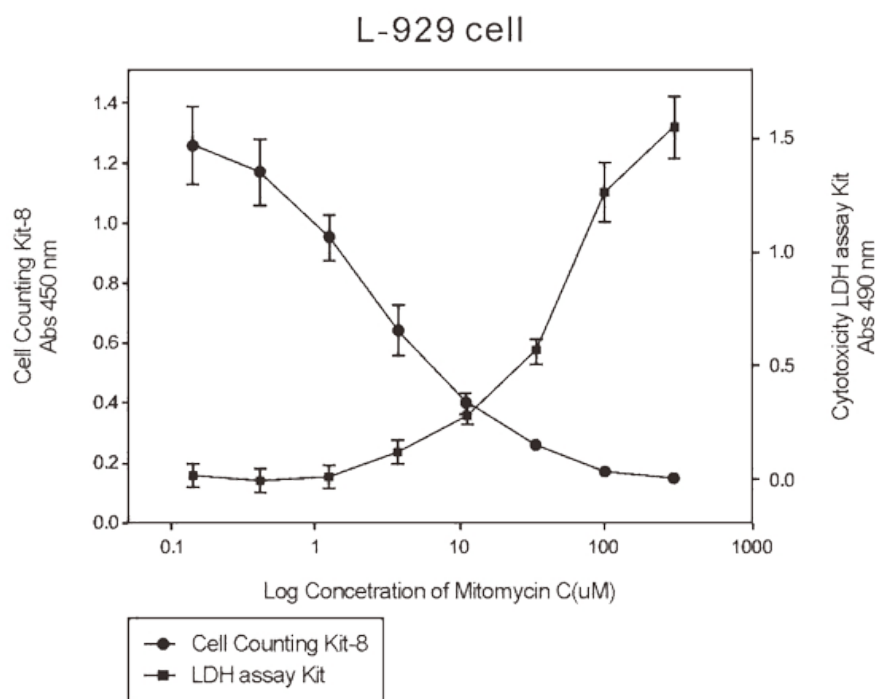


图2: 丝裂霉素C对L-929细胞的毒性

三. 注意事项

1. 96 孔板的选择: 直接法中贴壁细胞和悬浮细胞都使用平底 96 孔板; 间接法中贴壁细胞使用平底 96 孔板, 悬浮细胞使用圆底或 V 底 96 孔板。
2. 使用 96 孔板进行检测时, 如果细胞培养时间较长, 一定要注意蒸发问题。

Caution: Product has not been fully validated for medical applications. For research use only.

Tel: (626) 353-8530 Fax: (626) 353-8530 E-mail: tech@glpbio.com

Address: 10292 Central Ave. #205, Montclair, CA, USA

Product Data Sheet

一方面，由于96孔板周围一圈最容易蒸发，可以采取弃用周围一圈的办法，改加相同量的PBS、水或培养液；另一方面，可以把96孔板置于靠近培养箱内水源的地方，以缓解蒸发。

3. 用酶标仪检测前需确保每孔内没有气泡，否则会干扰测定。

4. 建议采用多通道移液器，以减小平行孔间的差异。

5. 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背景空白（仅含培养基），以用于消除背景。

6. 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等因素，都会造成细胞释放乳酸脱氢酶增加。

产品描述

Cytotoxicity LDH Assay Kit是通过测定细胞释放到培养基中的乳酸脱氢酶 (LDH) 活性进而测定细胞损害的试剂盒。LDH是存在于细胞质的一种酶，当细胞膜受到损伤时，LDH会释放到培养基中。由于释放出的LDH稳定，检测培养基中LDH量可以作为测定死细胞和受损细胞数量的指标。

本试剂盒可以测定受损细胞所释放出的LDH，其原理是LDH催化乳酸生成丙酮酸和NADH，NADH通过电子载体可将水溶性四唑盐(黄色)还原成甲臃产物(红色)，甲臃产物的吸光度与LDH量呈正比，利用此原理可以测定死细胞和受损细胞的数量。



图1: Cytotoxicity LDH Assay Kit的工作机制

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(直接法)。也可以分离细胞后，加到培养基中检测(间接法，分离的细胞可以做其他实验)。

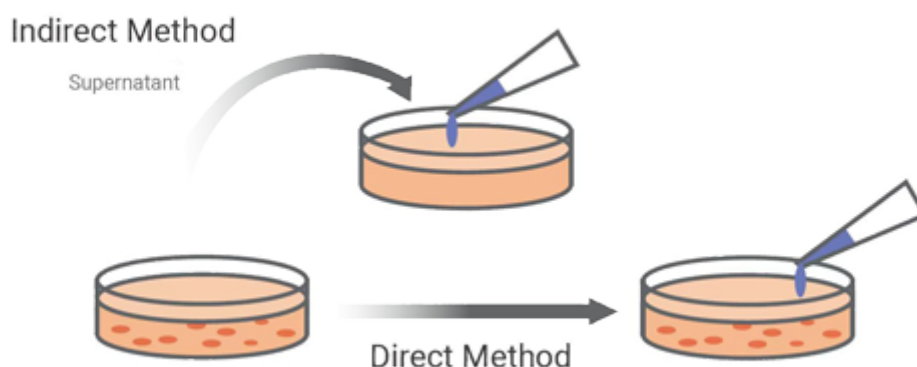


图2: 直接法和间接法测定 LDH 活性

Caution: Product has not been fully validated for medical applications. For research use only.

Tel: (626) 353-8530 Fax: (626) 353-8530 E-mail: tech@glpbio.com

Address: 10292 Central Ave. #205, Montclair, CA, USA