

乳酸脱氢酶（LDH）释放法细胞增殖与毒性定量检测试剂盒产品说明书

主要用途

乳酸脱氢酶（LDH）释放法细胞增殖与毒性定量检测试剂是一种旨在通过酶联连续反应系统检测由于细胞损伤导致的细胞内稳定的乳酸脱氢酶释放到细胞外，使四唑盐染料碘硝基氯化四氮唑（INT）还原为红色甲臍（formazan），即比色法定量测定酶活性，以评价活体细胞增殖的权威而经典的技术方法。该技术经过精心研制、成功实验证明的。适用于各种药物、化学、环境因子和营养因子处理的贴壁或悬浮生长中的动物或人体细胞。替代传统的同位素^[51 Cr]释放检测的最佳选择。产品严格无菌，即到即用，简捷敏感，性能稳定，显色清晰，检测准确，重复性好。

技术背景

细胞凋亡或坏死而造成的细胞膜结构的损害或完全裂解导致细胞浆内的酶释放外泄到培养液里，其中包括活性稳定的乳酸脱氢酶。乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase; LDH）释放法的测定是基于在乳酸脱氢酶的作用下，还原NAD⁺反应生成的NADH，再与氧化型2-（4-碘苯）-3-（4-硝基苯）-5-苯四唑（Iodonitrotetrazolium; INT）在硫辛酰胺脱氢酶（diaphorase）的催化下反应生成红色生色产物甲臍（formazan），在490nm波长下产生吸收峰，从而确定释放的乳酸脱氢酶的活性，作为细胞膜完整性的标志；吸光值与细胞死亡或毒性程度成线性正相关。酶联连续反应系统为：

产品内容

裂解液（Reagent A）	毫升
补充液（Reagent B）	毫升
反应液（Reagent C）	毫升
显色液（Reagent D）	毫升
终止液（Reagent E）	毫升
标准液（Reagent F）	微升（另购）
产品说明书	1份

保存方式

保存在-20℃冰箱里，反应液（Reagent C）和显色液（Reagent D）避免光照；有效保证6月

用户自备

96孔细胞培养板：用于细胞操作的容器

细胞培养箱：用于孵育反应

孔板离心机：用于沉淀细胞

酶标仪：用于定量检测染色后的细胞

实验步骤

一、贴壁细胞检测

1. 准备 96 孔细胞培养板的待测细胞（每孔 100 微升）：包括未处理的对照细胞（**样品对照孔**），未处理的后续裂解的细胞（**样品最大酶活性对照孔**），以及药物处理的细胞（**处理样品孔**），并做好标记（细胞密度为每孔 2×10^3 至 2×10^4 细胞）
2. 到规定的检测时间点前 1 小时，从湿润的细胞培养箱里取出待测的 96 孔细胞培养板（注意：*确保细胞培养液维持在 100 微升容量*）
3. 加入 xx 微升**裂解液（Reagent A）**到未处理的后续裂解的细胞孔里（**样品最大酶活性对照孔**）
4. 同时加入 xx 微升**补充液（Reagent B）**到其余所有检测孔里
5. 放回湿润的细胞培养箱里，继续培养 1 小时，即规定检测时间
6. 从湿润的细胞培养箱里取出待测的 96 孔细胞培养板
7. 放进孔板离心机离心 10 分钟，速度为 250g
8. 分别小心移取 50 微升上清液到新的 96 孔板的相应孔里，避免触摸细胞颗粒，同时注意做好标记
9. 分别加入 xx 微升**反应液（Reagent C）**（注意：使用前，须混匀）
10. 分别加入 xx 微升**显色液（Reagent D）**
11. 摇动 96 孔板混匀
12. 在室温下孵育 30 分钟，避免光照
13. （选择步骤）分别加入 xx 微升**终止液（Reagent E）**
14. 即刻放进酶标仪里测读：波长 490nm
15. 计算处理样品实际吸光读数：处理样品孔吸光读数—样品对照孔吸光读数
16. 计算样品细胞最大酶活性的实际吸光读数：样品最大酶活性对照孔吸光读数—样品对照孔吸光读数
17. 计算细胞毒性或死亡率（%）：

$$\left(\text{处理样品实际吸光读数} - \text{样品细胞最大酶活性的实际吸光读数} \right) \times 100$$

18. 或绘制细胞生长曲线：纵座标（Y 轴）为实际吸光读数（A）；横坐标（X 轴）为细胞数或时间点或药物浓度；据此计算其 LD₅₀

二、悬浮细胞检测

1. 准备 96 孔细胞培养板的待测悬浮细胞（每孔 100 微升）：包括未处理的对照细胞（**样品对照孔**），未处理的后续裂解的细胞（**样品最大酶活性对照孔**），以及药物处理的细胞（**处理样品孔**），并做好标记（细胞密度为每孔 5×10^3 至 5×10^4 细胞）
2. 到规定的检测时间点前 1 小时，从湿润的细胞培养箱里取出待测的 96 孔细胞培养板（注意：*确保细胞培养液维持在 100 微升容量*）
3. 加入 xx 微升**裂解液（Reagent A）**到未处理的后续裂解的细胞孔里（**样品最大酶活性对照孔**）
4. 同时加入 xx 微升**补充液（Reagent B）**到其余所有检测孔里
5. 放回湿润的细胞培养箱里，继续培养 1 小时，即规定检测时间
6. 从湿润的细胞培养箱里取出待测的 96 孔细胞培养板
7. 放进孔板离心机离心 10 分钟，速度为 250g
8. 分别小心移取 50 微升上清液到新的 96 孔板的相应孔里，避免触摸细胞颗粒，同时注意做好标记
9. 分别加入 xx 微升**反应液（Reagent C）**（注意：使用前，须混匀）
10. 分别加入 xx 微升**显色液（Reagent D）**

11. 摇动 96 孔板混匀
12. 在 30℃ 温度下孵育 30 分钟，避免光照
13. (选择步骤) 分别加入 xx 微升 **终止液 (Reagent E)**
14. 即刻放进酶标仪里测读：波长 490nm
15. 计算处理样品实际吸光读数：处理样品孔吸光读数 - 样品对照孔吸光读数
16. 计算样品细胞最大酶活性的实际吸光读数：样品最大酶活性对照孔吸光读数 - 样品对照孔吸光读数
17. 计算细胞毒性或死亡率 (%)：

(处理样品实际吸光读数 ÷ 样品细胞最大酶活性的实际吸光读数) × 100

18. 或绘制细胞生长曲线：纵座标 (Y 轴) 为实际吸光读数 (A)；横坐标 (X 轴) 为细胞数或时间点或药物浓度；据此计算其 LD₅₀

注意事项

1. 本产品为 100 次 (1 个 96 孔板) 操作
2. 操作时须戴手套
3. 整个操作须无菌操作
4. 建议每个样品安排 3 个孔，即重复 3 次，计算时取其平均值
5. 检测体系相应增加，试剂用量按比例相应增加：例如 200 微升检测体系，试剂用量增加 1 倍
6. 每孔中的培养液需 100 微升，避免使用周边培养孔 (常常液体蒸发而减少)
7. 系统测试，可以加入 10 微升 **标准液 (Reagent G)** 到 50 微升无细胞的细胞培养液里，然后加入反应液和显色液即可
8. 细胞裂解效果不佳，可以使用 20 微升 **裂解液 (Reagent A)** 处理
9. 孵育时，须避光
10. 染色完成后，建议即刻检测，最迟不得超过 1 小时
11. 细胞培养和处理时，避免使用草酸 (OXALATE)，草氨酸 (OXAMATE) 和 EDTA，否则影响检测的准确性
12. 血清含有乳酸脱氢酶，建议使用浓度不要超过 1%
13. 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会造成细胞自然释放乳酸脱氢酶
14. 酚红会干扰检测
15. 样品最大酶活性对照孔或最大 OD 吸光读数与细胞裂解程度密切相关
16. 如果用户没有孔板离心机，则移取上清液时格外小心
17. 如果用户没有匹配的波长，可以使用波长 470nm 至 570nm 之间的任一波长替代
18. 本公司提供系列细胞繁殖检测试剂产品

质量标准

1. 本产品经鉴定性能稳定
2. 本产品经鉴定检测敏感