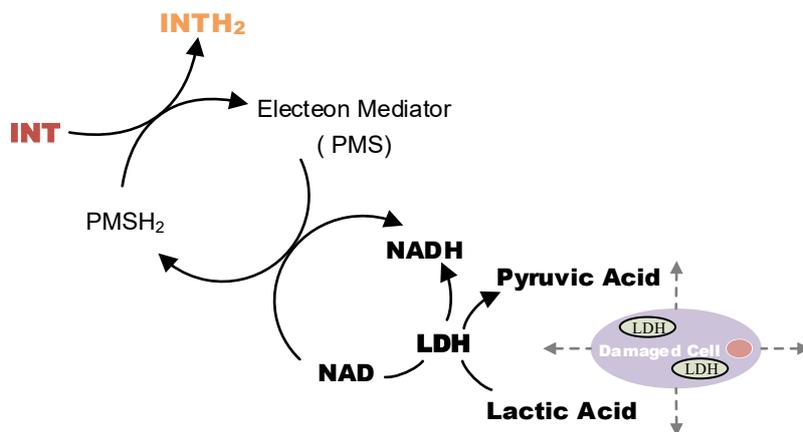




乳酸脱氢酶 (LDH) 细胞增殖及毒性检测试剂盒
LDH Cell Proliferation And Cytotoxicity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



乳酸脱氢酶 (LDH) 细胞增殖及毒性检测试剂盒

LDH Cell Proliferation And Cytotoxicity Assay Kit

一、产品描述

乳酸脱氢酶 (LDH) 是存在于细胞质内的稳定酶, 其释放量与细胞膜完整性密切相关。LDH 主要存在于细胞内, 正常情况下不能透过完整细胞膜。当细胞受到损伤、发生凋亡或坏死时, 细胞膜通透性增加, LDH 被释放至细胞培养液中, 因此检测培养液中 LDH 活性可作为评估细胞毒性、增殖状态及药物筛选的重要指标, 广泛应用于肿瘤研究、免疫毒性测试与化合物安全性评价等领域。

LDH 可催化乳酸转化为丙酮酸, 同时使氧化型辅酶 I (NAD⁺) 还原为还原型辅酶 I (NADH)。生成的 NADH 在递氢体吩嗪二甲酯硫酸盐 (PMS) 的作用下, 将碘硝基氯化四氮唑 (INT) 还原为紫红色甲臍化合物。产物在 490 nm 处具有特征吸收峰, 通过吸光值变化即可表征 LDH 的活性, 通过对 LDH 活性的定量分析, 可间接反映细胞的损伤程度。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件
Lysis Buffer	液体 2 mL×1 瓶	4°C 保存
Solution I	液体 2 mL×1 瓶	4°C 保存
Solution II	液体 2 mL×1 瓶	-20°C 避光保存
Solution III	液体 2 mL×1 瓶	-20°C 避光保存
Solution IV	液体 5 mL×1 瓶	-20°C 避光保存
Solution V	液体 6 mL×1 瓶	4°C 保存
Stop Solution	液体 3 mL×1 瓶	4°C 保存

三、产品使用说明

1. LDH 释放检测

① LDH 底物液的配制 (现配现用)

使用前按照 Solution I : Solution II : Solution III : Solution IV : Solution V = 2:2:2:5:6 的体积比进行配制, 现配现用, 充分混匀即为 LDH 底物液。

②收集对数期细胞，根据细胞的大小和生长速度调整细胞悬液浓度，设置细胞梯度，分于 96 孔板，每孔 100 μL ，置于 37°C、5% CO_2 培养箱中培养使细胞贴壁，培养 6-24 h；

③吸去培养液，使用 PBS 洗涤一次。更换为 200 μL 新鲜培养液（推荐使用含 1%血清的低血清培养液或无血清培养液）；

④每孔加 20 μL **Lysis Buffer**，反复吹打数次混匀；

⑤继续在 37°C、5% CO_2 细胞培养箱中孵育 30 min；

⑥将细胞培养板使用多孔板离心机 1500 rpm 离心 5 min（没有多孔板离心机，可吸入离心管离心）。分别取各孔的上清液 120 μL ，转移至新的 96 孔板相应孔中；

⑦每孔中加入 100 μL **LDH 底物液**，充分混匀，室温避光静置 10-30 min，也可用铝箔包裹后置于水平摇床或侧摆摇床上缓慢摇动 10-30 min；

⑧每孔加入 30 μL **Stop Solution**，立即使用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度（OD 值）。（以吸光度为 Y 轴，细胞浓度为 X 轴绘图，评估细胞增殖情况）。

2. 细胞毒性检测（用于药物筛选）

①收集对数期细胞，根据细胞的大小和生长速度调整细胞悬液浓度，分于 96 孔板，每孔 100 μL ，置于 37°C、5% CO_2 培养箱中培养使细胞贴壁，培养 6-24 h；

②加入不同药物进行处理，并设置适当对照。药物刺激完毕后，尽量吸除上清液，更换为 200 μL 新鲜培养液（推荐使用含 1%血清的低血清培养液或无血清培养液），每孔加 20 μL **Lysis Buffer**，反复吹打数次混匀；

③继续在 37°C、5% CO_2 细胞培养箱中孵育 30 min；

④将细胞培养板使用多孔板离心机 1500 rpm 离心 5 min（没有多孔板离心机，可吸入离心管离心）；分别取各孔的上清液 120 μL ，转移至新的 96 孔板相应孔中；

⑤每孔中加入 100 μL **LDH 底物液**，充分混匀，室温避光静置 10-30 min，也可用铝箔包裹后置于水平摇床或侧摆摇床上缓慢摇动 10-30 min；

⑥每孔加入 30 μL **Stop Solution**，立即使用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度（OD 值）。（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）。

四、注意事项

- ①操作过程中应避免细胞样本溶血，以避免红细胞内的 LDH 干扰结果；
- ②由于使用 96 孔板进行检测，若细胞培养时间较长，需注意蒸发的问题。可以采取弃用周围一圈的办法，改加 PBS、蒸馏水或培养液；也可将 96 孔板置于靠近培养箱内水源的地方，以减少蒸发；
- ③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；
- ④离心步骤对于获得澄清上清液至关重要，可用多孔板离心机或小心移取上清液至离心管中离心；
- ⑤接种时注意细胞悬液一定要混匀，以避免细胞沉淀下来，导致每孔中的细胞数量不等，可以每接种几个孔就混匀一次；
- ⑥为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.

Liaodong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

