改良型乳酸脱氢酶（LDH）活性检测试剂盒

（本试剂盒仅供科研使用）

产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0717	改良型乳酸脱氢酶（LDH）活性检测试剂盒 LDH Cytotoxicity Assay Kit	100T

产品内容

名称	规格	储存条件
工作液/ Working Solution	5.5mL	-20℃，避光
终止液/ Stop Solution	5.5mL	-20℃，避光
裂解液/ Lysis Solution	1.1mL	-20℃，避光

一、产品说明

乳酸脱氢酶（Lactate Dehydrogenase，LDH）（EC 1.1.1.27）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。

乳酸脱氢酶（LDH）活性检测试剂盒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。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)还原成甲臜产物（红色），甲臜产物的吸光度与 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。

本试剂盒中的试剂对细胞无害，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)。

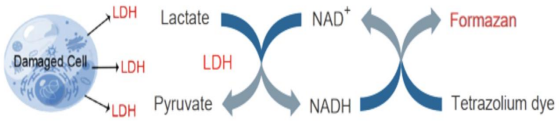


图 1: LDH 检测原理

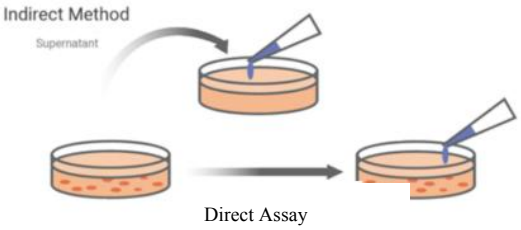


图 2: 直接法盒间接法测定 LDH 活性

二、测定步骤

1、对照设置（以 96 孔细胞培养板为例）

1.1 高对照：含细胞、培养基，每孔加入 10μL 裂解液，用于测定细胞的最大可释放 LDH。

1.2 高对照空白：含培养基，每孔加入 10μL 裂解液，用于扣除高对照本底吸光值。

1.3 低对照：含细胞、裂解液，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。

1.4 背景空白：含培养基，用于扣除低对照及样品本底吸光度值。

组别设置示例：

试剂名称（μL）	样品	高对照	高对照空白	低对照	背景空白
培养基			100	10	110
细胞	100	100		100	
药物	10				
裂解液		10	10		

2、预实验（确定 LDH 细胞毒性测定的最佳细胞数量）：

2.1 使用细胞计数板计数制备的细胞悬液中的细胞数量，然后接种细胞。

2.2 按照比例依次用培养基等比稀释成细胞浓度梯度 (一般做 5-7 个梯度, 每组 4-6 个复孔)。

2.3 接种后培养 2-4h，使细胞贴壁。

2.4 在高对照孔和高对照空白孔中加入 10μL 裂解液，在低对照孔中加入 10μL 培养基，37℃ CO_2 培养箱内培养 30min。

2.5 直接法：每孔吸掉 50μL 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 50μL 工作液，震荡混匀。

间接法：从每孔中吸取 50μL 上清液至新的 96 孔板中，而后在新的 96 孔板中，每孔加入 50μL 工作液，震荡混匀。

注：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。根据实验目的选择合适的方法进行测定。

2.6 室温避光孵育 30min。

2.7 在每孔中加入 50μL 终止液后，立即用酶标仪测定 490nm 处的吸光度。

注：根据如下要求选择最佳的细胞浓度：A. 高对照孔和低对照孔的 OD 值差>0.2；B. 在线性曲线上的该细胞浓度 OD 值＜2.0。

3、毒性检测

3.1 在 96 孔板中接种细胞悬液（100μL/孔，10^4-10^5 个），将培养板放在培养箱中预培养 24h。

3.2 向培养板中加入不同浓度的待测药物。

3.3 根据实验需求，将培养板在培养箱孵育适当时间（如 6、12、24、48h 等）。

3.4 在高对照孔和高对照空白孔中加入 10μL 裂解液，在低对照孔中加入 10μL 培养基，37℃ CO_2 培养箱内培养 30min。

3.5 直接法：每孔吸掉 50μL 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 50μL 工作液，震荡混匀。

间接法：从每孔中吸取 50μL 上清液至新的 96 孔板中，而后在新的 96 孔板中，每孔加入 50μL 工作液，震荡混匀。

注：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。根据实验目的选择合适的方法进行测定。

3.6 室温避光孵育 30min。

3.7 在每孔中加入 50μL 终止液后，立即用酶标仪测定 490nm 处的吸光度。

注：配合使用 CCK-8（货号 YFXCA01）可获得死细胞和活细胞数据。

4、数据处理

细胞毒性 Cytotoxicity(%)=[(X-Z)/(Y-Z)] × 100%

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；

三、注意事项

1、 96 孔板的选择：直接法检测时，贴壁细胞和悬浮细胞都使用平底 96 孔板；间接法检测时，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、 加入工作液后，吸光度与反应时间成正比，建议 0-30min 内检测。由于不同细胞差异较大，建议首次检测时，分别测定 0min、5min、10min、20min、30min 时的吸光值，以便确定最佳反应时间。

3、 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：由于 96 孔板边缘孔最容易蒸发，建议弃用边缘孔、改加相同量的 PBS 或者水或者培养液；或者把 96 孔板放在靠近培养箱内水源的地方，以缓解蒸发。

4、 检测前需要确保孔内没有气泡，否则会干扰测定结果。

5、 建议使用多通道移液器加样，以减小平行孔间的差异。

6、 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。

7、 细胞过度生长、密度过大、离心速度过大、培养箱内温差过大等因素，都会造成细胞释放乳酸脱氢酶增加。

8、 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。

9、 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。