

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K771-M

产品规格: 96T

检测仪器: 酶标仪(450 nm)

**Elabscience®乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性
比色法测试盒**

**Lactate Dehydrogenase (LDH) Cytotoxicity
Colorimetric Assay Kit**

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒可用于以乳酸脱氢酶(LDH)释放为指标的细胞毒性检测。

检测原理

乳酸脱氢酶催化乳酸和 NAD^+ 反应产生丙酮酸和 NADH , NADH 在 PMS 作用下, 将电子传递给 WST-8, 产生黄色的产物, 其在 450 nm 有特征吸收峰, 从而可以通过比色法来定量乳酸脱氢酶的活性。

提供试剂和物品

编号	名称	规格(Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	裂解液 (Lysis Solution)	2 mL×1 瓶	-20 ℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	1.5 mL×2 支	-20 ℃ 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	显色剂 (Chromogenic Agent)	1.5 mL×2 支	-20 ℃ 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	终止剂 (Stop Solution)	1.5 mL×2 支	-20 ℃ 保存 6 个月
	96 孔酶标板	1 板	
	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明: 试剂严格按上表中的保存条件保存, 不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂, 使用前请先离心, 以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(450 nm)，细胞培养箱，酶标板离心机。

试剂准备

① 检测前，所有试剂需平衡至室温，试剂四若出现凝固，可提前放至37℃恒温箱中温浴20 min，待其完全澄清后方可使用。

② 反应工作液的配制：

按试剂二：试剂三=1：1的体积比混匀，现配现用，按需配置，注意避光。

实验关键点

① 根据实际测定需求，设置不同类别的对照孔。

② 必须使用活细胞。

操作步骤

样本处理

- ① 96 孔细胞培养板根据以下分类加样(每一种分类至少三个复孔):
 - 空白孔:** 100 μL 无细胞的培养液(推荐使用含 1%血清的低血清或无血清培养液);
 - 样本对照孔:** 100 μL 待检测细胞(约含 5000-10000 个细胞);
 - 最大酶活对照孔:** 100 μL 待检测细胞(约含 5000-10000 个细胞);
 - 样本测定孔:** 100 μL 待检测细胞(约含 5000-10000 个细胞);
 - ② 将 96 孔细胞培养板置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 含 5% CO_2 空气及 100%湿度的细胞培养箱中培养 24 h。
 - ③ 向步骤②中的空白孔, 样本对照孔中分别加入 10 μL 的培养液
向步骤②中的样本测定孔中加入 10 μL 不同浓度的药物刺激。
 - ④ 37 $^{\circ}\text{C}$, 含 5% CO_2 空气及 100%湿度的细胞培养箱中培养(根据不同实验细胞需求选择适当的孵育条件和时间)。
 - ⑤ 在结束培养前 1 h 从细胞培养箱中取出 96 孔细胞培养板, 在最大酶活对照孔中加入 10 μL 的试剂一, 并反复吹打混匀;
 - ⑥ 37 $^{\circ}\text{C}$, 含 5% CO_2 空气及 100%湿度的细胞培养箱中继续培养 1 h;
 - ⑦ 将 96 孔细胞培养板用酶标板离心机 400 \times g 离心 5 min, 吸取上清液待测。
- 注:** 若无酶标板离心机, 可将细胞液用移液枪吸打均匀后, 移取至离心管中, 使用普通离心机离心。

样本检测

- ① 取 96 孔酶标板，按上述细胞培养过程划分为空白孔、样本对照孔、最大酶活对照孔和样本测定孔，然后向各孔中加入 50 μL 对应的待测上清液。
- ② 向步骤①酶标板各孔中加入 50 μL 反应工作液，酶标仪震板 5 s 混匀。
- ③ 37 $^{\circ}\text{C}$ ，孵育 10 min；(反应时间可根据显色深浅延长或缩短，建议测定多个不同时间点的 OD 值，以便于筛选，尽量控制样品对照孔的 OD 值小于 0.8，最大酶活对照孔的 OD 值小于 2.0)。
- ④ 向步骤③中各孔加入 20 μL 试剂四，混匀，终止反应。
- ⑤ 酶标仪上 450 nm 波长处测定各孔 OD 值，并设定 600 nm 参比波长，扣除参比波长的 OD 值，为所需有效吸光度值。

结果计算

计算公式:

$$\text{细胞毒性} \begin{matrix} (\%) \end{matrix} = \frac{A_2 - A_1}{A_3 - A_1} \times 100\%$$

注解:

A₁: 样本对照孔 OD 值-空白孔 OD 值

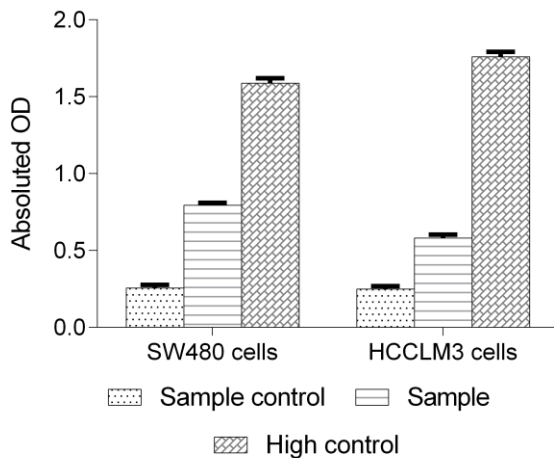
A₂: 样本测定孔 OD 值-空白孔 OD 值

A₃: 最大酶活对照孔 OD 值-空白孔 OD 值

附录1 实例分析

例如检测SW480细胞和HCCLM3细胞(数据仅供参考):

例如按说明书操作,检测SW480细胞和HCCLM3细胞数据如下(数据仅供参考):



声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。