

乳酸脱氢酶细胞毒性试剂盒比色法

编号: ml300865

检测波长: 450nm

检测数量: 微量法 96 孔

注 意:

- 1、正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定;
- 2、为了您的安全和健康, 请佩戴好防护用具;

测定意义:

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。

测定原理:

乳酸脱氢酶催化乳酸氧化生成丙酮酸, 同时使 NAD^+ 还原生成 NADH 和 H^+ , NADH 在 1-mPMS 的作用下使 WST-8 显橙黄色, 通过测定 450nm 下吸光值增加速率, 进而计算乳酸脱氢酶活性。

自备仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、离心机、恒温箱、震荡仪、冰、蒸馏水

试剂清单:

试剂名称	规格	数目	贮藏	备注
试剂一	液体 2.5mL	x1	-20°C	
试剂二	粉剂	x1	-20°C,避光	
试剂三	液体 5mL	x1	4°C,避光	
试剂四	液体 1.2mL	x1	-20°C,避光	
试剂五	液体 10mL	x1	4°C	

样本处理 (按照步骤依次操作):

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 μ L 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 μ L 待检测细胞(约含 5000-10000 个细胞);

最大酶活对照孔: 100 μ L 待检测细胞(约含 5000-10000 个细胞);

样本测定孔: 100 μ L 待检测细胞(约含 5000-10000 个细胞);

② 将 96 孔细胞培养板置于 37 $^{\circ}$ C, 含 5%CO₂ 空气及 100%湿度的细胞培养箱中培养 24h。

③ 向步骤②中的空白孔, 样本对照孔中分别加入 10 μ L 的培养液向步骤②中的样本测定孔中加入 10 μ L 不同浓度的药物刺激。

④ 37 $^{\circ}$ C, 含 5%CO₂ 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 1h 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 μ L 的试剂一, 并反复吹打混匀;

⑥ 37 $^{\circ}$ C, 含 5%CO₂ 空气及 100%湿度的细胞培养箱中继续培养 1h;

⑦ 将 96 孔细胞培养板用酶标板离心机 400 \times g 离心 5min, 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

实验准备：

- 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；
- 2、试剂二的制备：瓶中加入 6mL 蒸馏水，充分溶解，冰上放置；
(用不完的试剂 -20°C 避光保存)
- 3、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm，温度设置 37°C；
- 4、工作液配置按比例配置为试剂二：试剂三：试剂四：试剂五=5 : 4 : 1 : 8；

测定操作：

- 1、在 96 孔板中依次操作

试剂名称 (μL)	样本测定孔	样本对照孔	最大酶活对照孔	空白孔
各孔的细胞上清	20	20	20	20
工作液	180	180	180	180
混匀，37°C，孵育 10min；测定各孔的吸光值记为 A				

注意：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。

结果计算：

计算公式： 细胞毒性(%)=(A2-A1)÷(A3-A1)×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

预实验的意义：

比色法试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过 3 - 5 组预实验，判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。