

乳酸脱氢酶细胞毒检测试剂盒比色法

规格：微量法 96孔

编号：JLC_K14837

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。

需自备的仪器和用品

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)

①96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：100μL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)；

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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 (μ L)	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

比色法检测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适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例

。