

乳酸脫氫酶細胞毒性檢測組使用說明

LDH Cytotoxicity Assay kit Product Information

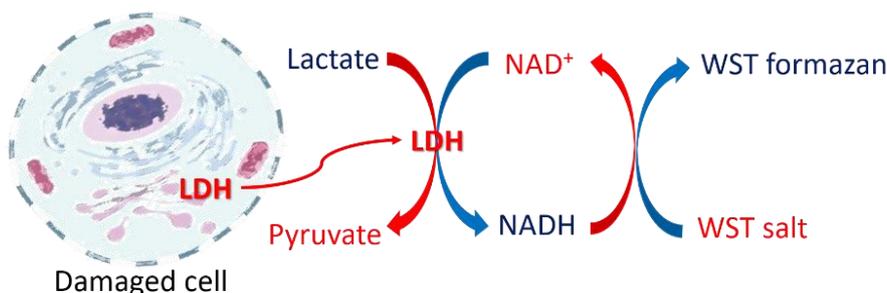
快速使用指引

1. 存放條件：呈色劑(A 劑)建議在避光與冷凍下(<-20 °C)。其餘試劑，在冷藏 4 °C下存放。正常存放條件下，套組可存放逾一年。
2. 可見光吸收光譜偵檢波長：450 nm。
3. 呈色劑(試劑 A)+套組緩衝液(試劑 B)=工作液。
4. 建議各溶液體積，工作液：樣品液：細胞裂解液(試劑 C)：反應停止液(試劑 D)=100：10：10：10 μL。

一、產品簡介

乳酸脫氫酶(Lactate dehydrogenase, LDH)是一種穩定且幾乎所有已知細胞都含有之酵素。而細胞之毒性研究常以細胞膜的損傷來衡量，當細胞膜損傷，細胞內的LDH就會釋放到溶液中，因此，我們可藉由測量溶液中的LDH的濃度，來研究溶液中的物質對細胞的毒性。

如下圖一，本產品使用新一代的高靈敏性水溶性四氮唑鹽(water soluble tetrazolium salt, WST salt)作為LDH的呈色劑。LDH自損傷的細胞釋出後，將套組中的乳酸(lactate)與菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺)催化，使之進行氧化還原反應，NAD⁺被還原成還原態NADH，NADH再進一步將四氮唑鹽還原成橘色水溶性之甲臍(formazan)，此產物在可見光吸收光譜波長450 nm處(OD₄₅₀)，產生強烈的變化，藉由光譜變化的多寡，便可計算溶液中的LDH濃度，得出損傷細胞的多寡。



圖一、LDH套組原理說明圖

二、套組內容、運送與儲存：

| | 500 tests | 2000 tests | 運送與儲存 |
|-----------------|---------------------|---------------------|------------------|
| 呈色劑 (試劑 A) | 10 mL 棕色玻璃瓶 X1 | 10 mL 棕色玻璃瓶 X4 | 4°C運送 -20°C儲存 |
| 套組緩衝液 (試劑 B) | 55 mL 棕色塑膠瓶 X1 | 55 mL 棕色塑膠瓶 X4 | |
| 細胞裂解液 (試劑 C) | 5.2 mL 半透明塑膠管 X1 | 5.2 mL 半透明塑膠管 X4 | 4°C運送 4°C儲存 |
| 反應停止液 (試劑 D) | 5.2 mL 藍蓋塑膠管 X1 | 5.2 mL 藍蓋塑膠管 X4 | |

三、產品使用步驟：

1. 準備細胞樣品：

1.1 收集懸浮或貼壁細胞：

可使用胰蛋白酶(Trypsin)將貼壁細胞自培養皿中取下，轉置於裝有培養液之離心管中。

1.2 將離心管離心(600 x g)十分鐘，讓細胞沉澱在底部。

1.3 去除上清液，以培養液清洗細胞一次。建議細胞濃度應控制在 $2-10 \times 10^3$ cells per well。

2. 準備工作液：

2.1 將套組在室溫下放置 30 分鐘以上，使試劑與室溫平衡。

2.2 取出呈色劑(試劑 A)，小心移除鋁蓋。加 5 mL 套組緩衝液(試劑 B)於呈色劑之棕色玻璃瓶中，稍加搖晃，使試劑 A 之固體狀試藥完全溶解。

2.3 將上述步驟 2.2 之溶液，倒回到套組緩衝液(試劑 B)之棕色塑膠瓶中。旋緊瓶蓋。

2.4 請儘速使用完上述之工作液，若未使用完，請放置於 4°C 冰箱，可保存一個月。

3. 進行實驗：

3.1 決定最佳細胞液濃度與最佳呈色反應時間：

如果您第一次使用本產品，或是您使用未曾使用過的細胞株，建議您根據下述步驟，先進行以下測試，以決定最適合進行此實驗之條件：

3.1.1 背景控制組(BLANK)：

在 96 孔盤適當之孔位中，每孔添加 100 μ L 之無細胞培養液，至少應進行 3 孔位(三重複實驗)。背景控制組實驗之實驗目的在測量所添加之試劑之背景值，所有實驗之測量結果應扣除此背景值。

3.1.2 低數值控制組(LOW Control)：

在 96 孔盤 A 排孔位中，添加 100 μ L 步驟 1.3 之細胞液，至少應進行 3 孔位(三重複實驗)。以無細胞培養液進行 2 倍數梯度稀釋。例如：在 96 孔盤之 A 排 1-3 孔位，加入 100 μ L 之無細胞培養液，充分混合均勻後，吸取 100 μ L，轉置於 B 排 1-3 孔位，再加入 100 μ L 之無細胞培養液，充分混合均勻後，吸取 100 μ L，轉置於 C 排 1-3 孔位。以此類推，以 A-G 排，進行七次 2 倍數梯度稀釋。

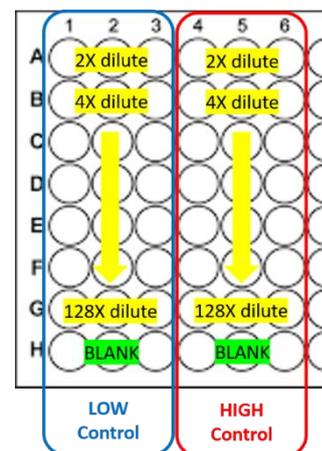
3.1.3 高數值控制組(HIGH Control)：

在 96 孔盤 A 排孔位中，添加 100 μ L 步驟 1.3 細胞液，至少應進行 3 孔位(三重複實驗)。以無細胞培養液進行 2 倍數梯度稀釋。例如：在 96 孔盤之 A 排 4-6 孔位，加入 100 μ L 之無細胞培養液，充分混合均勻後，吸取 100 μ L，轉置於 B 排 4-6 孔位，再加入 100 μ L 之無細胞培養液，充分混合均勻後，吸取 100 μ L，轉置於 C 排 4-6 孔位。以此類推，以 A-G 排，進行七次 2 倍數梯度稀釋。

3.1.4 若使用貼壁細胞，請在培養箱中培養細胞(5% CO₂，90%濕度，37 °C)至少隔夜，確定細胞確實貼附在孔盤上。去除上清液，以 100 μ L 新鮮的培養液清洗細胞一次；若使用懸浮細胞，忽略此培養步驟。

3.1.5 在每個高數值控制組孔位，額外添加 10 μ L 細胞裂解液(試劑 C)，充分混合均勻；在每個低數值控制組，額外添加 10 μ L 滅菌的 dd H₂O，充分混合均勻。

注意事項：請小心混合，不要產生氣泡影響測量結果。



- 3.1.6 在培養箱中培養細胞(5% CO₂，90%濕度，37 °C)。實際培養時間取決於每種細胞株跟藥劑反應的時間，請使用者根據經驗，或是文獻，自行判斷。在培養細胞結束後，輕輕搖晃孔盤，使 LDH 分散均勻。
- 3.1.7 若使用的細胞株是懸浮細胞，將孔盤離心(250 x g)兩分鐘，讓細胞沉澱在孔盤底部。若使用貼壁細胞，不須進行此離心步驟。將每個孔位之上清液 10 μL，轉置到另一光學分析用之 96 孔盤中。
- 3.1.8 在每個孔位中，添加 100 μL 步驟 2.3 之工作液，混合均勻後，在室溫避光下呈色，反應時間 30 分鐘。
- 3.1.9 以孔盤可見光光譜儀，測量所有孔位之 OD₄₅₀ 值。
注意事項：呈色反應時間可以延長或縮短，取決於實際狀況。可重複測量孔盤之 OD₄₅₀ 值，以確定最佳的呈色反應時間；而最佳細胞液濃度：在此細胞濃度下，高數值對造組實驗之 OD₄₅₀ 約在 2.0，同時，其低數值對造組之 OD₄₅₀ 小於 0.8，兩者至少差距 0.2 以上，越大越好。
- 3.1.10 若要終止呈色反應，可額外在每個孔位添加 10 μL 反應停止液(試劑 D)，充分混合均勻後，呈色反應會立刻停止，在 24 小時內，OD₄₅₀ 值不會有明顯的變化，但須注意將孔盤避光，並且避免孔盤水分逸散。即使如此，仍建議您儘快測量 OD₄₅₀ 值，以避免不必要的誤差產生。

3.2 未知物質細胞毒性實驗：

3.2.1 參考下表一，設計實驗。在 96 孔盤適當之孔位中，每組實驗至少應進行 3 孔位(三重複實驗)。

注意事項：請參考步驟 3.1.9，選擇最佳細胞濃度。

3.2.2 在 96 孔盤中接種細胞：若使用貼壁細胞，請在培養箱中培養細胞(5% CO₂，90%濕度，37 °C)至隔夜，確定細胞確實貼附在孔盤上。去除上清液，以 100 μL 培養液清洗細胞一次。

3.2.3 在高數值控制組的孔位中，添加 10 μL 細胞裂解液(試劑 C)。在未知物質毒性實驗組，添加 10 μL 欲實驗之物質溶液。低數值控制組添加 10 μL 無細胞培養液。

注意事項：若實驗之物質對 PBS 或是細胞培養液之溶解度很差，可嘗試使用溶劑溶解該物質，再以最少量(避免溶劑嚴重影響細胞生理)，添加入未知物質毒性實驗組孔位中。須留意其他控制組實驗，亦必須添加等量、無實驗物質之相同溶劑。

表一 各組實驗建議添加體積

| 添加體積(μL) | 背景控制組 | 低數值控制組 | 高數值控制組 | 未知物質實驗組 |
|----------|-------|--------|--------|---------|
| 無細胞培養液 | 110 | 10 | 0 | 0 |
| 細胞液 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| 待測物質溶液 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| 細胞裂解液 | 0 | 0 | 10 | 0 |

3.2.4 在培養箱中培養細胞(5% CO₂，90%濕度，37 °C)，培養時間與細胞株種類與實驗之物質反應時間有關。在培養細胞結束後，輕輕搖晃孔盤，使 LDH 分散均勻。

3.2.5 若使用的細胞株是懸浮細胞，將孔盤離心(250 x g)兩分鐘，讓細胞沉澱在孔盤底部。若使用貼壁細胞，不須進行此離心步驟。將每個孔位之上清液 10 μL，轉置到另一光學分析用之 96 孔盤中。

3.2.6 在每個孔位中，添加 100 μL 步驟 2.3 之工作液，混合均勻後，在室溫避光下進行呈色反應，

反應時間請參考步驟 3.1.9，選擇最佳的呈色反應時間。

3.2.7 以孔盤可見光光譜儀，測量所有孔位之 OD₄₅₀ 值。

3.2.8 若要終止呈色反應，可額外在每個孔位添加 10 μL 反應停止液(試劑 D)，充分混合均勻後，呈色反應會立刻停止，在 24 小時內，OD₄₅₀ 值不會有明顯的變化，但須注意將孔盤避光，並且避免孔盤水分逸散。即使如此，仍建議您儘快測量 OD₄₅₀ 值，以避免不必要的誤差產生。

4. 計算未知物之細胞毒性：

$$\text{細胞毒性(\%)} = \frac{\text{未知物實驗組OD}_{450} - \text{低數值控制組OD}_{450}}{\text{高數值控制組OD}_{450} - \text{低數值控制組OD}_{450}} \times 100\%$$

四、產品實測結果：

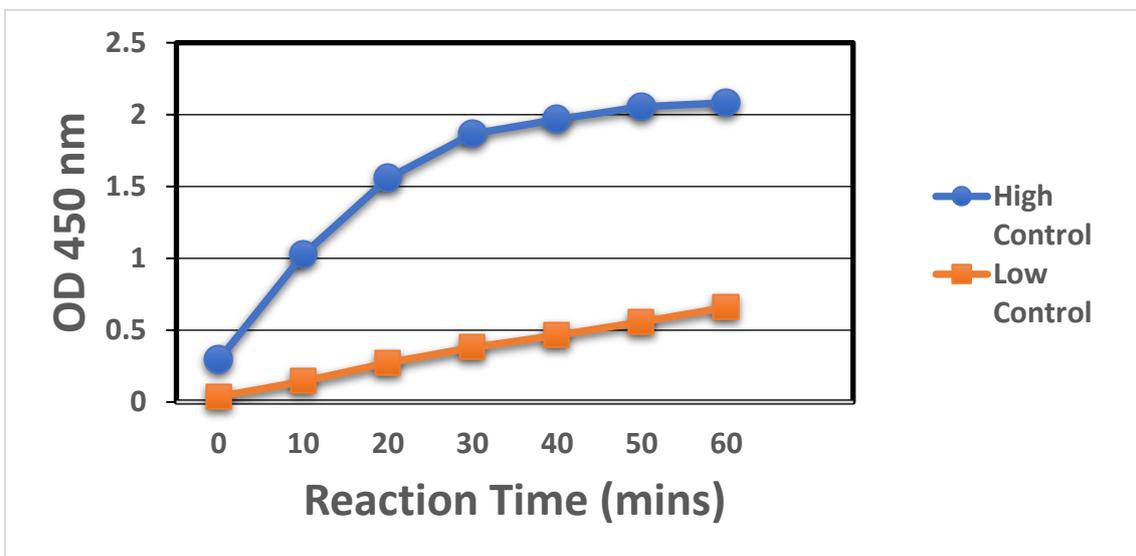


Fig. 1. The LDH activity of A549 cells (5,000 cells per well). A549 cells were diluted in 96-well cell culture plate with DMEM medium containing 10% FBS.

五、困難排除

| 問題 | 可能原因 | 解決方式 |
|---------------------------------|----------------------|---|
| 高背景值 | 培養液含有高濃度 LDH | 使用無血清培養液，或是降低培養液中的血清含量至 5%以下，或是更低。 |
| | 待測物質溶液或是培養液中含有高還原性物質 | 高還原性物質，如：維他命 C，可直接參與 WST 的呈色反應。建議使用如 DMEM、RPMI、F12 等，不含還原性之培養液。 |
| 在低數值控制組仍有高的 OD ₄₅₀ 值 | 細胞濃度太高 | 重新滴定或是稀釋細胞液。 |
| | 待測物質溶液或是培養液中含有高還原性物質 | 高還原性物質，如：維他命 C，可直接參與 WST 的呈色反應。建議使用如 DMEM、RPMI、F12 等，不含還原性之培養液。 |
| | 細胞因不適當培養液，狀態很差 | 某些細胞株在無血清培養液中，即使培養時間不長，仍然會損傷細胞。可增加血清含量 1-5%。 |

| | | |
|-------------------------------------|--------------------------------------|---|
| OD ₄₅₀ 值偏低 | 細胞濃度太低 | 重新滴定或是配置細胞液。 |
| | 待測物質溶液或是培養液中含有抑制 LDH 活性或是抑制呈色反應之物質 | --額外做一含待測物質溶液之對照組實驗 ^{*1} 。 --丙酮酸會抑制 LDH 活性，請使用無丙酮酸的培養液。 |
| OD ₄₅₀ 值在三個重複實驗中，產生很大的變化 | 培養液中有氣泡 | 用細針將氣泡弄破，或是使用孔盤離心機，在 1000 xg 下離心一分鐘。 |
| | 在呈色反應時，孔盤因水分揮發，造成體積與濃度變化 | 在孔盤四周的孔位，揮發速度較快。可在實驗時，在四周的孔位添加培養液，以減緩揮發速度，並且避免使用這些孔位當作實驗孔位。 |
| | 溶液混合不均勻 | 細胞裂解液只有少量添加到高數值對照組，但此步驟若混合不均勻，對實驗結果影響很大。請確實反覆抽吸數次，以充份混合溶液。勿抽吸太大力，使溶液溢出。 |
| | 添加的體積不正確 | 定期校正移液器。 |
| | 使用單管移液器，每孔添加溶液的間隔時間太久，使呈色反應時間產生大的差異。 | 建議在添加工作液與反應停止液時，使用多管的移液器。 |

^{*1} 可在表一中，視情況需要，根據下列建議，增加一組對照組實驗，以驗證待測物質或是培養液中的物質，是否會抑制 LDH 活性：

在 96 孔盤中進行三重實驗，每孔添加 25 μL 待測物質溶液、25 μL 無細胞培養液，與 50 μL LDH 溶液(0.05 U/mL，本產品並無提供，需額外購買)。

*感謝國立清華大學選用本產品。

聚創新材料股份有限公司

IMT FORMOSA New Materials Co., Ltd.

電話 Phone: 0926-159317

電郵 Email: polycreatives@outlook.com

聯絡人 Contact: Peter Hsu

