

概述

Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST®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。LDH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。

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WST® (无色) 还原成甲贖产物 (橙色)，WST®甲贖产物的吸光度与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。

本试剂盒中试剂不会和活细胞反应，而且对细胞无损害，可以直接添加到含有细胞的培养基中检测 (一步法)。也可以分离细胞后，加到培养基中检测 (低损伤法，分离的细胞可以做其他实验)。本试剂盒采用稳定性高的WST®，配置后的溶液可以长时间保存，不需要现配现用，适用于高通量筛选。

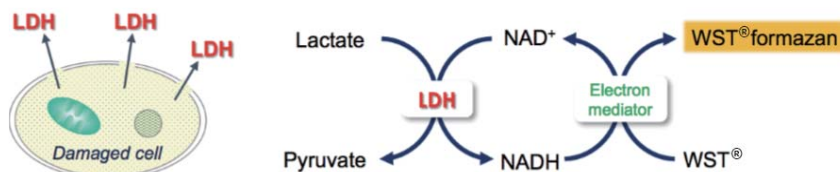
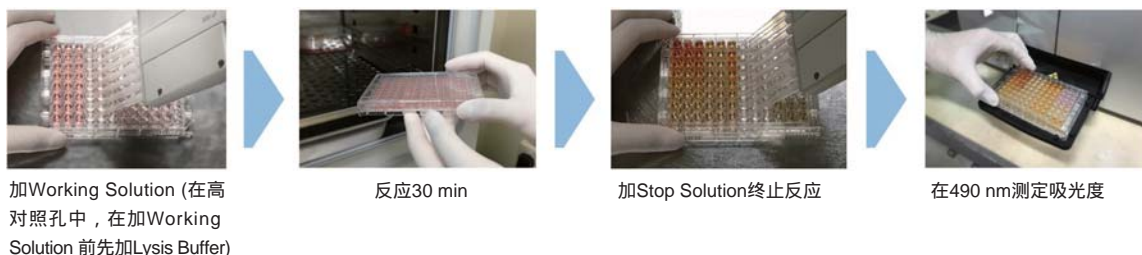


图1 用Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST® 测定细胞毒性的原理

特点

- 双重选择：有2种检测方法 (一步法、低损伤法)
- 操作简单：不需要分离死细胞和活细胞，就可检测死细胞的LDH *一步法
- 仪器常用：采用常规酶标仪检测
- 稳定方便：Working Solution可冷藏保存6个月，不需要现配现用
- 双重验证：配合使用CCK-8可获得死细胞和活细胞的结果

操作示意图



加Working Solution (在高对照孔中，在加Working Solution 前先加Lysis Buffer)

反应30 min

加Stop Solution终止反应

在490 nm测定吸光度

试剂盒内含

	100次	500次	2,000次
Dye Mixture	x 1	x 1	x 4
Assay Buffer	11 ml x 1	55 ml x 1	55 ml x 4
Lysis Buffer	1.1 ml x 1	5.5 ml x 1	5.5 ml x 4
Stop Solution	5.5 ml x 1	27.5 ml x 1	27.5 ml x 4

储存条件

0-5

所需的设备和材料

- CO₂培养箱
- 酶标仪 (带有490 nm滤光片)
- 细胞培养用96孔板
 - * 一步法：贴壁细胞和悬浮细胞都使用平底96孔板。
 - * 低损伤法：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。

测定前的注意事项

- 本试剂盒使用玻璃容器及铝盖，建议使用时戴手套。
- 因为每种细胞的LDH量不同，建议通过预实验确定高对照和低对照的吸光度差异最大的细胞数。
- 培养基中动物血清中的LDH会增加背景吸收，建议设置一个培养基背景对照来校正。动物血清中的LDH活性较高时，可以通过降低血清浓度来减小其中的LDH造成的背景吸收，一般将血清浓度降低到5%会显著减小背景而不影响细胞活力。不推荐用1% BSA来代替血清检测细胞介导的细胞毒性。

配制Working Solution

- 1) 100次：加入1 ml Assay Buffer至Dye Mixture瓶子中，充分混合。
500次、2,000次：加入5 ml Assay Buffer至Dye Mixture瓶子中，充分混合。
- 2) 完全溶解后转移到Assay Buffer的瓶子中，充分混合。
Working Solution请在0-5℃ 避光保存，稳定性可达6个月。

一步法

- * 适用不需要收集活细胞进行其它实验的LDH 检测。
- * 如果您需要收集活细胞进行其它实验，请选择方法2：低损伤法。

预实验 (细胞数的最佳化)

* 因为每种细胞的LDH量不同，为了得到最好的显色效果，推荐做预实验确定最佳细胞量。

- 1) 用培养基洗涤细胞后，制成 5×10^5 cells/ml的细胞悬液。
- 2) 向96孔板中每孔加入100 μ l培养基。
- 3) 如图2所示，向96孔板中A行 (高对照和低对照各3个孔) 加入100 μ l细胞悬液后，用多通道移液器按1/2比例用培养基稀释成一个系列细胞梯度。
另外，准备高对照Blank和背景Blank (只有培养基) 各3个孔。
- 4) 在37℃ CO₂培养箱中培养。
* 培养时间设定与细胞毒性实验“3) 在37℃ CO₂培养箱内培养合适的时间。”一致。
- 5) 在高对照孔中加入10 μ l Lysis Buffer。
- 6) 在37℃ CO₂培养箱中培养30 min。
- 7) 在每孔中加入100 μ l Working Solution，采用包裹铝箔等方法避光，在室温反应。
* 加入Working Solution后，吸光度与反应时间成正比，建议0-30 min内检测。
* 由于不同细胞差异较大，建议首次实验时，分别测定0 min，5 min，10 min，20 min，30 min时的吸光度，以便确定最佳反应时间。

- 8) 在每孔中加入50 μ l Stop Solution后，立刻用酶标仪测定490 nm的吸光度。

* 以吸光度为X轴，细胞浓度为Y轴绘图，根据下面的要求选择最佳的细胞浓度：

- 高对照和低对照的O.D.值之差>0.2;
- 在线性曲线上的该细胞浓度的O.D.值<2.0。

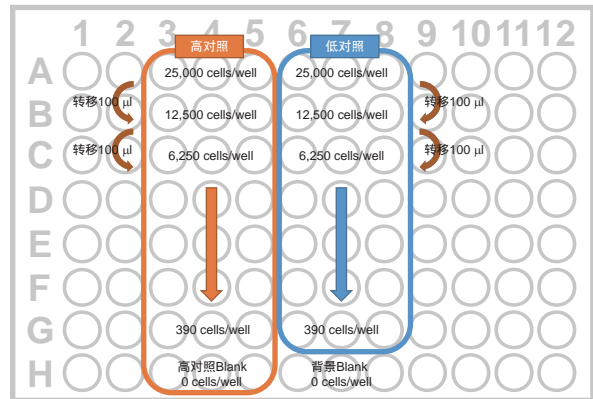


图2 预实验96孔板细胞梯度配置例

细胞毒性实验

- 1) 吸取50 μ l用培养基稀释过的细胞悬液至平底96孔板中。
* 用贴壁细胞时，接种细胞至96孔板过夜预培养，换成新的50 μ l培养基后，进行操作步骤 2)。
- 2) 加入50 μ l含有药物的培养基 (表1)。
- 3) 在37℃ CO₂培养箱内培养合适的时间。
- 4) 在高对照孔中加入10 μ l Lysis Buffer后，在37℃ CO₂培养箱内培养30 min。
- 5) 在每个孔中加入100 μ l Working Solution后，在避光、室温的条件下培养。
* 培养时间设定与预实验“7) 在每孔中加入100 μ l Working Solution，采用包裹铝箔等方法避光，在室温反应。”一致。
- 6) 在每孔中加入50 μ l Stop Solution后，立刻用酶标仪测定490 nm 的吸光度。

表1 各孔的溶液量 (一步法)

	样品	样品 Blank	高对照	高对照 Blank	低对照	背景 Blank
培养基	-	50 μ l	50 μ l	100 μ l	50 μ l	100 μ l
细胞悬液	50 μ l	-	50 μ l	-	50 μ l	-
药物	50 μ l	50 μ l	-	-	-	-
Lysis Buffer	-	-	10 μ l	10 μ l	-	-

低损伤法

- * 适用需要收集活细胞进行其它实验的LDH检测。
- * 如果您不需要收集活细胞进行其它实验，请选择方法1：一步法。

预实验（细胞数的最佳化）

- * 因为每种细胞的LDH量不同，为了得到最好的显色效果，推荐做预实验确定最佳细胞量。
- 1) 用培养基洗涤细胞后，制成 5×10^5 cells/ml的细胞悬液。
- 2) 向96孔板中每孔加入100 μ l培养基。
- 3) 如图3所示，向96孔板中A行 (高对照和低对照各3个孔) 加入100 μ l细胞悬液后，用多通道移液器按1/2比例用培养基稀释成一个系列细胞梯度。
另外，准备高对照Blank和背景Blank (只有培养基) 各3个孔。
- 4) 在每孔中加入100 μ l培养基。
- 5) 在37 $^{\circ}$ C CO₂培养箱中培养。
* 培养时间设定与细胞毒性实验“3) 在37 $^{\circ}$ C CO₂培养箱内培养合适的时间。”一致。
- 6) 在高对照孔中加入20 μ l Lysis Buffer，在低对照孔和背景Blank孔中加入20 μ l培养基。
- 7) 在37 $^{\circ}$ C CO₂培养箱中培养30 min。
- 8) 96孔板离心2 min (250 \times g)，使悬浮细胞沉淀。
- 9) 从每个孔中吸取100 μ l上清液至新的96孔板中。 * 为了避免吸出细胞，请小心吸取上清液。
- 10) 在每孔中加入100 μ l Working Solution，采用包裹铝箔等方法避光，在室温反应。
* 加入Working Solution后，吸光度与反应时间成正比，建议0-30 min内检测。
* 由于不同细胞差异较大，建议首次实验时，分别测定0 min，5 min，10 min，20 min，30 min时的吸光度，以便确定最佳反应时间。
- 11) 在每孔中加入50 μ l Stop Solution后，立刻用酶标仪测定490 nm的吸光度。

- * 以吸光度为X轴，细胞浓度为Y轴绘图，根据下面的要求选择最佳的细胞浓度：
- 高对照和低对照的O.D.值之差 >0.2 ;
- 在线性曲线上的该细胞浓度的O.D.值 <2.0 。

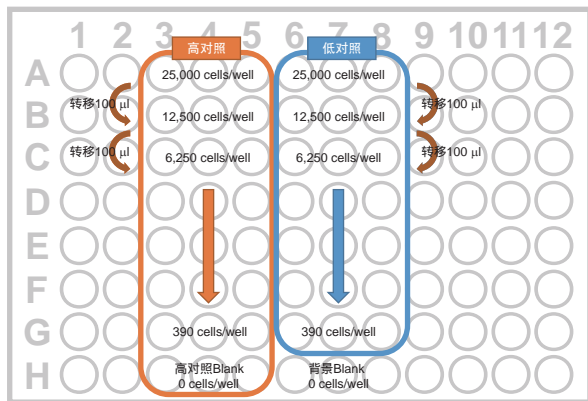


图3 预实验96孔板细胞梯度配置例

细胞毒性实验

- 吸取100 μ l用培养基稀释过的细胞悬液至96孔板中。
* 用贴壁细胞时，接种细胞至96孔板过夜预培养，换成新的100 μ l培养基后，进行操作步骤2)。
- 加入100 μ l含有药物的培养基（表2）。
- 在37 $^{\circ}$ C CO₂培养箱内培养合适的时间。
- 在高对照孔中加入20 μ l Lysis Buffer后，在低对照孔和背景Blank孔中加入20 μ l培养基，在37 $^{\circ}$ C CO₂培养箱内培养30 min。
- 96孔板离心2 min (250 \times g)，使悬浮细胞沉淀。
- 从每个孔中吸取100 μ l上清液至新的96孔板中。 * 为了避免吸出细胞，请小心吸取上清液。
- 在每个孔中加入100 μ l Working Solution后，在避光、室温的条件下培养。 * 培养时间与预实验的“10) 在每孔中加入100 μ l Working Solution，采用包裹铝箔等方法避光，在室温反应。”一致。
- 在每孔中加入50 μ l Stop Solution后，立刻用酶标仪测定490 nm 的吸光度。

表2 各孔的溶液量（低损伤法）

	样品	样品 Blank	高对照	高对照 Blank	低对照	背景 Blank
培养基	20 μ l	120 μ l	100 μ l	200 μ l	120 μ l	220 μ l
细胞悬液	100 μ l	-	100 μ l	-	100 μ l	-
药物	100 μ l	100 μ l	-	-	-	-
Lysis Buffer	-	-	20 μ l	20 μ l	-	-

结果的计算

计算「样品孔-样品Blank孔」「高对照孔-高对照Blank孔」「低对照孔-背景Blank孔」的吸光度后，算出n=3的平均值。细胞损伤率根据如下公式算出。

$$\text{细胞损伤率(\%)} = [(A - C)/(B - C)] \times 100$$

A：样品的吸光度 (样品孔 - 样品Blank孔)

B：高对照的吸光度 (高对照孔 - 高对照Blank孔)

C：低对照的吸光度 (低对照孔 - 背景Blank孔)

实验例

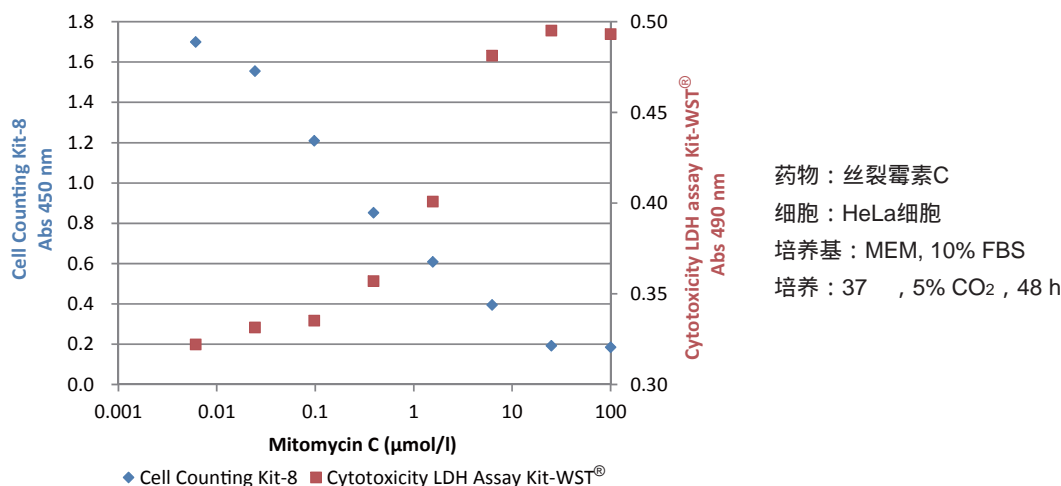


图4 丝裂霉素C对HeLa细胞的毒性

药物：丝裂霉素C
细胞：HeLa细胞
培养基：MEM, 10% FBS
培养：37℃, 5% CO₂, 48 h

校正 (一步法)

吸光度校正

虽然高对照孔的体积和其它实验孔不一致，但按照Lambert-Beer定律，理论上的误差仅为0.1%，Lambert-Beer定律吸光度： $A = \epsilon CL$ (ϵ ：摩尔吸光系数， C ：浓度， L ：光路长)。由于在高对照孔中加入Lysis Buffer，浓度 C 变成0.91倍，光路长 L 变成1.1倍，校正吸光度 $A' = \epsilon \times (C \times 0.91) \times (L \times 1.1) = \epsilon CL \times 1.001$ ，即 $A' = A \times 1.001$ (例如：高对照孔的吸光度 $A = 0.5$ 时，校正后的高对照孔吸光度 $A' = 0.5005$)。所以一般不需要校正吸光度，如果担心吸光度误差，请按照上述方法进行校正。

体积校正

因为高对照孔的体积(110 μl)比其它对照(100 μl)多10 μl，所以除了高对照孔以外每个孔加入10 μl培养基。

关联产品

- 细胞增殖·毒性检测	CK04	Cell Counting Kit-8(CCK-8)
	CK13	Stop Solution for CCK-8
- 凋亡检测	AD10	Annexin V, FITC ; PI
		Apoptosis Detection Kit

WST®: WST是同仁化学研究所的注册商标

DOJINDO 东仁化学科技(上海)有限公司

如果您需要更多的信息或者有任何问题可以通过以下方式联系我们：

上海
上海市零陵路899号飞洲国际广场27楼J座
邮编：200030
电话：400-823-9388
网址：<http://www.dojindo.cn>
E-mail: info@dojindo.cn

北京
北京市朝阳区德外马甸裕民路12号元辰鑫大厦E1-210室
邮编：100029
电话：010-8225-1765
网址：<http://www.dojindo.cn>
E-mail: info@dojindo.cn

修订日期：2017年4月