

細毒® CellToxi®

乳酸脫氫酶細胞毒性檢測組使用說明

LDH Cytotoxicity Assay kit Product Information

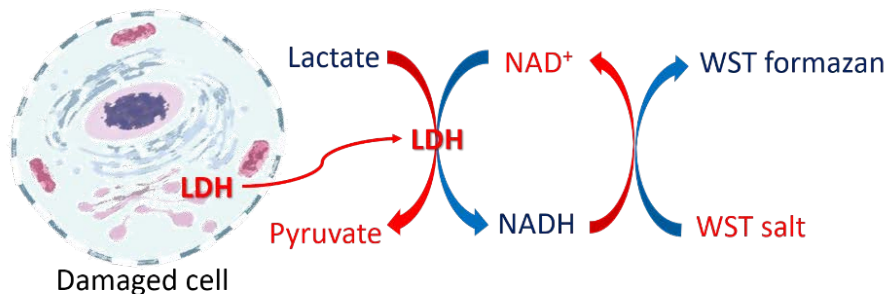
快速使用指引

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	4°C運送 4°C儲存
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	
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，視使用所需之體積，分裝到 15 mL 離心管， $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷凍避光保存，可延長保存期限。

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 $100\ \mu\text{L}$ 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)：

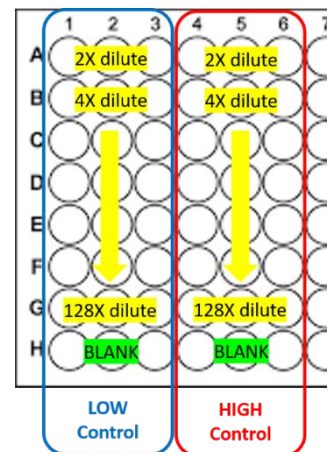
在 96 孔盤 A 排孔位中，添加 $100\ \mu\text{L}$ 步驟 1.3 之細胞液，至少應進行 3 孔位(三重複實驗)。以無細胞培養液進行 2 倍數梯度稀釋。例如：在 96 孔盤之 A 排 1-3 孔位，加入 $100\ \mu\text{L}$ 之無細胞培養液，充分混合均勻後，吸取 $100\ \mu\text{L}$ ，轉置於 B 排 1-3 孔位，再加入 $100\ \mu\text{L}$ 之無細胞培養液，充分混合均勻後，吸取 $100\ \mu\text{L}$ ，轉置於 C 排 1-3 孔位。以此類推，以 A-G 排，進行七次 2 倍數梯度稀釋。

3.1.3 高數值控制組(HIGH Control)：

在 96 孔盤 A 排孔位中，添加 $100\ \mu\text{L}$ 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 $100\ \mu\text{L}$ 之無細胞培養液，充分混合均勻後，吸取 $100\ \mu\text{L}$ ，轉置於 B 排 4-6 孔位，再加入 $100\ \mu\text{L}$ 之無細胞培養液，充分混合均勻後，吸取 $100\ \mu\text{L}$ ，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% CO_2 ，90%濕度， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$)至少隔夜，確定細胞確實貼附在孔盤上。去除上清液，以 $100\ \mu\text{L}$ 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 $10\ \mu\text{L}$ 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 $10\ \mu\text{L}$ 滅菌的 dd H_2O ，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 OD_{450} 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， OD_{450} 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 OD_{450} 值，以避免不必要的誤差產生。

4. 計算未知物之細胞毒性：

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

四、產品實測結果：

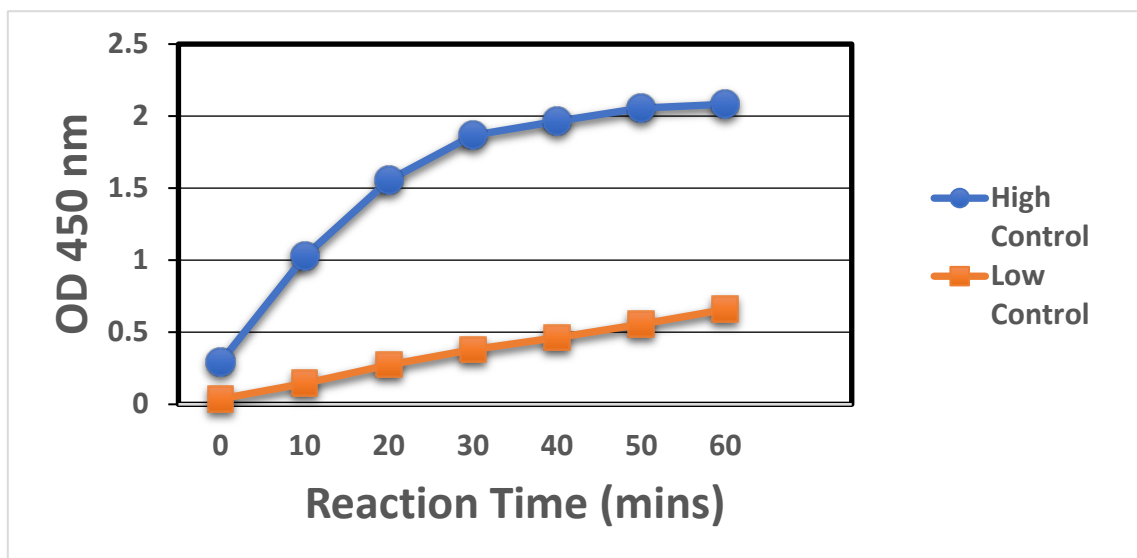


Fig. 1. The LDH activity of A549 cells (5,000 cells per well). A549 cells were diluted in 96-well cell culture plate with DMEM medium containing 10% FBS.

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 孔盤中進行三重複實驗，每孔添加 25 μ L 待測物質溶液、25 μ L 無細胞培養液，與 50 μ L 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

