

# 中文说明书

## LDH-Glo™

# Cytotoxicity Assay

适用产品目录号：J2380 和 J2381



# LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay

所有技术文献的英文原版均可在 [www.promega.com/protocols](http://www.promega.com/protocols) 获得。请访问该网址以确定您使用的说明书是否为最新版本。如果您在使用该试剂盒时有任何问题，请与 Promega 北京技术服务部联系。  
电子邮箱：[chinatechserv@promega.com](mailto:chinatechserv@promega.com)

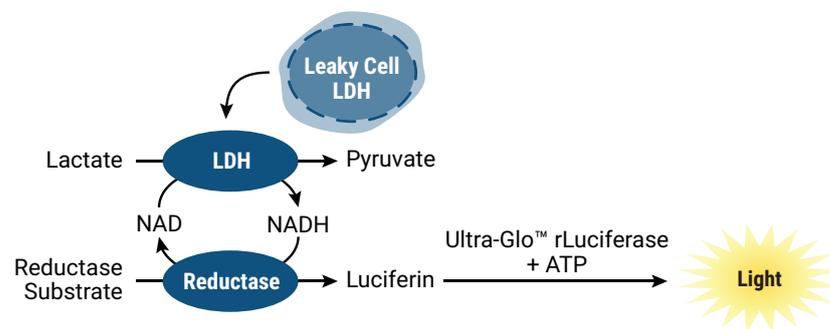
|                                               |    |
|-----------------------------------------------|----|
| 1. 产品描述 .....                                 | 2  |
| 2. 产品组分和储存条件 .....                            | 4  |
| 3. 实验前的准备 .....                               | 5  |
| 3. A. 用户需提供的材料 .....                          | 5  |
| 3. B. 试剂准备 .....                              | 5  |
| 3. C. 检测线性范围和 LDH 稀释倍数的建议 .....               | 6  |
| 3. D. 温度和试剂兼容性 .....                          | 7  |
| 3. E. 检测实验的孵育时间 .....                         | 7  |
| 3. F. 微孔板和设备 .....                            | 7  |
| 4. 操作步骤 .....                                 | 8  |
| 4. A. 推荐的对照 .....                             | 8  |
| 4. B. 细胞毒性检测操作步骤示例 .....                      | 8  |
| 4. C. LDH 阳性对照 .....                          | 10 |
| 5. 注意事项 .....                                 | 11 |
| 5. A. 细胞培养基和血清 .....                          | 11 |
| 5. B. LDH 在培养基中和在冷冻状态下的稳定性 .....              | 12 |
| 5. C. 使用终止液以获得稳定的发光信号 .....                   | 13 |
| 5. D. 与活力检测或其它检测试剂盒联合使用 .....                 | 13 |
| 6. 附录 .....                                   | 14 |
| 6. A. 检测球状体 ( SPHEROID ) 培养物中时间依赖性的细胞毒性 ..... | 14 |
| 6. B. 在 ADCC 实验中检测细胞特异性的细胞毒性 .....            | 15 |
| 6. C. 评估细胞数量和细胞增殖 .....                       | 16 |
| 6. D. 参考文献 .....                              | 17 |
| 6. E. 相关产品 .....                              | 17 |

## 1. 产品描述

乳酸脱氢酶(LDH)是一种稳定的可溶性胞质酶,存在于多种细胞中。当细胞质膜出现破损时,该酶会快速释放到培养基中。因此,LDH 是细胞毒性研究中广泛使用的一种标志物。

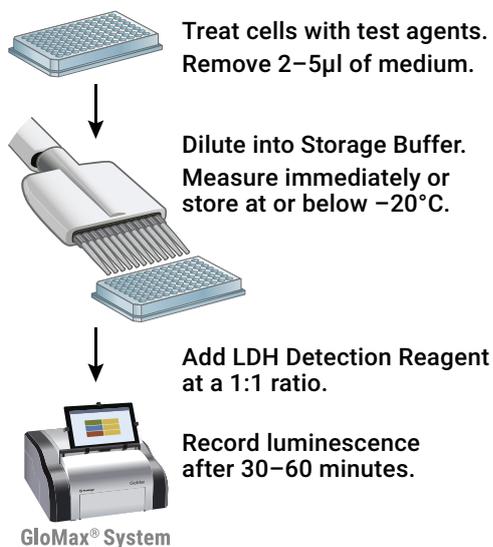
LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay 提供了一种简单的生物发光方法来定量 LDH 的释放。利用该方法得到的发光信号明亮、灵敏度高,因而能够测定细胞数量较少的样品(例如:3D 微组织球状体、微流体细胞培养芯片、原代细胞和干细胞)中的细胞毒性。

LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay 的检测方案为:将 LDH 检测试剂(含有乳酸、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 [NAD<sup>+</sup>]、还原酶、还原酶底物和 Ultra-Glo™ 超稳萤光素酶)加入经稀释的细胞培养基样品中。如果样品中含有 LDH,那么如图 1 所示的酶偶联反应将开始并同时进行。产生的发光信号与样品中 LDH 的含量成比例。发光信号会持续增强,直到所有还原酶底物消耗殆尽,反应信号不再处于本检测的线性范围之内。



**图 1. LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay 的原理。** 乳酸脱氢酶(LDH)催化乳酸氧化,同时 NAD<sup>+</sup> 还原为 NADH。还原酶利用 NADH 和还原酶底物生成萤光素(Luciferin),然后 luciferin 被 Ultra-Glo™ 超稳萤光素酶转化,产生生物发光信号。本过程中产生的发光信号与样品中 LDH 的含量成正比。

操作步骤示意图:



**图 2. LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay 操作步骤。** 为了检测从死细胞中释放出来的 LDH，取出少量培养基 (2-5 µl)，加入 LDH 储存缓冲液中稀释（见第 3.B 节）。使用的稀释倍数（25-100 倍）取决于细胞的数量以及培养基中是否存在血清（见第 3.C 节的表 1）。在已稀释的样品中加入等体积的 LDH 检测试剂，测定 LDH 的活性。

## 2. 产品组分和储存条件

| 产品                          | 规格    | 目录号   |
|-----------------------------|-------|-------|
| LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay | 10 ml | J2380 |

试剂盒里包含的试剂足够在 96 孔板中进行 200 次反应（50 μl 样品 + 50 μl 配制好的 LDH 检测试剂）。具体包括：

- 10 ml LDH Detection Enzyme Mix
- 55 μl Reductase Substrate
- 1 瓶 Lactate Dehydrogenase

| 产品                          | 规格    | 目录号   |
|-----------------------------|-------|-------|
| LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay | 50 ml | J2381 |

试剂盒里包含的试剂足够在 96 孔板中进行 1,000 次反应（50 μl 样品 + 50 μl 配制好的 LDH 检测试剂）。具体包括：

- 50 ml LDH Detection Enzyme Mix
- 275 μl Reductase Substrate
- 1 瓶 Lactate Dehydrogenase

**储存条件：**将整个试剂盒在 -65°C 以下保存。或者，将 Reductase Substrate 在 -65°C 以下避光保存，其它组分在 -30°C 至 -10°C 保存。试剂盒组分的冻融次数不要超过 3 次。



在处理细胞、细胞培养试剂等生物危险品时，请使用个人防护设备，并遵守您所在机构的相关安全指南和操作要求。

### 3. 实验前的准备



在开始实验之前，请务必仔细阅读整个操作步骤（第 3、4 节），以熟悉试剂盒的检测流程。

#### 3.A. 用户需提供的材料

- 细胞和细胞培养基；
- LDH 储存缓冲液（第 3.B 节；200mM Tris-HCl (pH 7.3)、10% 甘油和 1% 牛血清蛋白）；
- 壁不透明且可与标准微孔板读数仪兼容的 96 孔或 384 孔板（底部透明或不透明）；
- 单通道和多通道移液器与吸头；
- 单通道和 12 通道的试剂槽；
- 具备读板功能的发光检测仪（例如，GloMax<sup>®</sup> Discover 发光检测仪，目录号 GM3000）；
- Triton X-100（可选）；
- 甲萘醌 Menadione（可选）。

#### 3.B. 试剂准备

##### LDH 检测试剂

1. 室温下融化 LDH Detection Enzyme Mix 和 Reductase Substrate。融化后，将 LDH Detection Enzyme Mix 平衡至室温。Reductase Substrate 应置于冰上。混匀融化后的组分，确保溶液在使用前保持均匀。
2. 在即将使用溶液之前，按照下表所示将 LDH Detection Enzyme Mix 和 Reductase Substrate 混匀，配制成 LDH 检测试剂。表中给出的体积是以 96 孔板形式进行实验，每孔使用 50  $\mu$ l 样品和 50  $\mu$ l LDH 检测试剂。准备好实验所需的足量试剂，注意在移液过程中可能会损失少量试剂。通常情况下，5 ml 的检测试剂足以满足一块 96 孔板的用量。

| 组分                       | 每孔反应 (96 孔板) | 每块 96 孔板   |
|--------------------------|--------------|------------|
| LDH Detection Enzyme Mix | 50 $\mu$ l   | 5 ml       |
| Reductase Substrate      | 0.25 $\mu$ l | 25 $\mu$ l |

3. 将 LDH 检测试剂轻轻颠倒五次混匀。

注意：将未使用的 LDH Detection Enzyme Mix 储存于  $-65^{\circ}\text{C}$  或  $-30^{\circ}\text{C}$  至  $-10^{\circ}\text{C}$  之间。将未使用的 Reductase Substrate 置于  $-65^{\circ}\text{C}$  以下避光保存。已配好的 LDH 检测试剂不可储存。

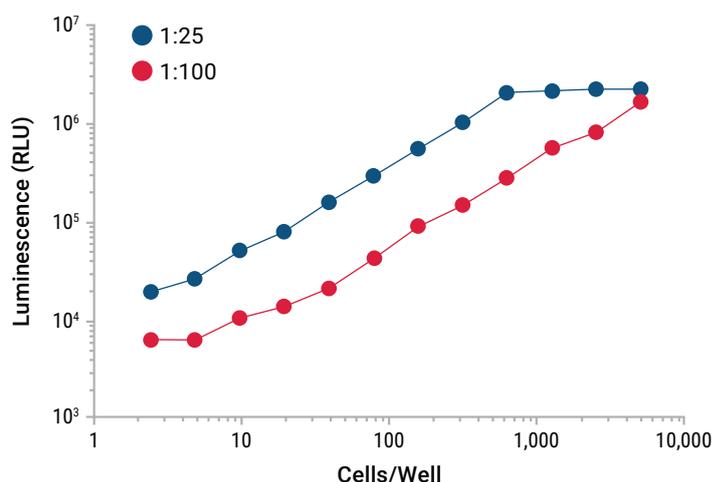
##### LDH 储存缓冲液

使用储备溶液配制 LDH 储存缓冲液，使其最终浓度为：200 mM Tris-HCl (pH 7.3)，10% 甘油和 1% BSA (牛血清蛋白)。LDH 储存缓冲液在  $4^{\circ}\text{C}$  保存，可用于稀释和冷冻样品。在培养基或 PBS 中冷冻的样品，其 LDH 活性会显著下降（详见第 5.B 节）。

### 3.C. 检测线性范围和 LDH 稀释倍数的建议

进行 LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay 时，取出一小部分的细胞培养基稀释到 LDH 储存缓冲液中，然后将其转移至检测板中。所需的稀释倍数取决于样品中 LDH 的含量、培养基中是否存在血清，以及反应时间。稀释倍数须进行优化，以适应本试剂盒的线性范围（图 3）。

样品稀释倍数越低，检测灵敏度就越高。但当细胞数量较多或培养基中存在血清时（其中含有相当量的 LDH），则需要较高的稀释倍数以延长检测的线性范围。样品稀释的一般性建议见表 1。



**图 3. LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay 的线性范围取决于稀释倍数。**在不含血清的 F12 培养基中裂解的 A549 细胞用 LDH 储存缓冲液以 1:25 或 1:100 的比例稀释，并在室温下与等体积的 LDH 检测试剂一起温育 60 分钟，然后记录发光信号。X 轴上的 Cells/Well（细胞 / 孔）表示稀释前的裂解细胞数量。在 LDH-Glo™ 检测中使用的细胞数量稀释了 25 倍和 100 倍。RLU = 相对发光单位。

**表 1. 设置 LDH-Glo™ Assay 时的稀释倍数建议**

| 培养基成分   | 细胞数 /100 $\mu$ l | 稀释倍数 |
|---------|------------------|------|
| 不含血清    | < 1,000          | 5X   |
|         | 1,000-10,000     | 25X  |
|         | 10,000-50,000    | 100X |
| 含 10%血清 | 1,000-25,000     | 100X |
|         | 25,000-50,000    | 300X |

### 3.D. 温度和试剂兼容性

发光信号的强度和稳定性对温度变化很敏感。为了获得一致的结果，请在使用试剂和样品前先将其平衡至室温 (22-25°C)。

避免待测样品中出现二硫苏糖醇 (DTT) 和其他还原剂。还原剂会与还原酶底物反应，因而增加背景。

### 3.E. 检测实验的孵育时间

加入 LDH 检测试剂 30-60 分钟后，记录发光信号。为了确保各种酶偶联反应达到平衡，不建议在加入试剂后 30 分钟内读数。孵育时间超过 60 分钟将增加检测的灵敏度，但请务必确认检测结果仍在线性范围内，且发光信号在持续增强。

### 3.F. 微孔板和设备

本检测试剂盒可兼容大部分用于测量发光信号的标准发光检测仪。有些仪器不要求调整增益，但是出于灵敏度和动态范围的考虑，其他仪器可能需要优化增益设置。每孔 0.5-1 秒的整合时间可作为参考。如想了解精确的仪器设置，请参阅仪器手册。

请使用可与您的发光检测仪兼容的不透明、白色多孔板 (例如，Corning Costar® #3917 的 96 孔板或 Costar® #3570 的 384 孔板)。在黑色板中发光信号会减弱，在透明板中，孔与孔之间发光信号的交叉干扰会增强。本说明书图中显示的 RLU (相对发光单位) 值会随着用来生成数据的微孔板和发光检测仪的不同而改变。尽管相对发光值会随着仪器的不同而变化，但是此类变化不会影响检测性能。

## 4. 操作步骤

本方案在 96 孔板中操作时使用 50  $\mu\text{l}$  样品和 50  $\mu\text{l}$  LDH 检测试剂。在该检测中样品和检测试剂的体积是可以调整的，只要二者的体积比维持在 1:1（例如，采用 384 孔板模式时，可使用 12.5  $\mu\text{l}$  样品和 12.5  $\mu\text{l}$  LDH 检测试剂）。

 在开始实验之前，**请阅读整个操作方案**以熟悉检测程序。

### 4.A. 推荐的对照

在每个检测板中都需设置推荐的对照，并按照与实验样品相同的方式来处理对照。

- **无细胞对照 (No-Cell Control)**：设置 3 个不含细胞的复孔作为阴性对照，用以测定培养基的背景。
- **仅含溶剂的细胞对照 (Vehicle-Only Cells Control)**：用未处理细胞设置 3 个复孔，作为溶剂对照。向溶剂对照孔中加入溶解待测化合物所使用的相同溶剂。
- **最大 LDH 释放对照 (Maximum LDH Release Control)** (可选)：设置 3 个复孔用于测定最大 LDH 释放。向仅含溶剂的细胞中加入 10% Triton X-100 (每 100  $\mu\text{l}$  添加 2  $\mu\text{l}$ )，孵育 10-15 分钟或更长时间，然后收集样品用于 LDH 检测。

**注意：**只有在计算细胞毒性百分比时才需要用到此对照。

### 4.B. 细胞毒性检测操作步骤示例

LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay 可用于测定由细胞毒性药物或化合物处理后所引起的细胞死亡。检测可在单个时间点或多个时间点进行。图 4 显示了通过从各个孔中重复取样来测量细胞毒性的实例。附录中提供的其他示例数据 (图 8 和 9) 显示了使用 LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay 来检测球状体 (spheroid) 培养物中时间依赖性的细胞毒性以及 ADCC (抗体依赖性细胞介导的细胞毒性作用) 实验中的细胞特异性的细胞毒性。

1. 设置 96 孔检测板，板中含有培养基和细胞。留出不含细胞的孔作为阴性对照，用以测定培养基中 LDH 的背景发光。
2. 将待测化合物和仅含溶剂的对照添加到适当的孔中 (详见第 4.A 节)。将处理过的检测板放回细胞培养箱培养至处理结束。
3. 在所需的实验时间点收集培养基样品，方法是将 2–5  $\mu\text{l}$  样品转移到 48–95  $\mu\text{l}$  的 LDH 储存缓冲液 (第 3.B 节) 中。上下移液 2-3 次 (不接触或干扰细胞) 使之混匀，确保样品均一。

**注意：**从孔中移除多达 10% 的初始培养基 (例如，当培养基的初始体积为 100  $\mu\text{l}$  时，在 4 个时间点分别取走 2.5  $\mu\text{l}$  的培养基) 不应影响剩余的细胞。相关示例请参见图 4。应根据经验确定培养基的移除对具体实验系统的影响。

**可选方案：**如需最大 LDH 释放对照，则向**仅含溶剂的细胞孔**中添加 2  $\mu\text{l}$  的 10% Triton X-100 (每 100  $\mu\text{l}$  初始体积)，混匀并孵育至少 10-15 分钟后取样。

4. 收集并稀释完所有样品后，执行步骤 5 的操作，或将样品保存在  $-20^{\circ}\text{C}$ ，以备将来检测。
5. 在检测当天，将冷冻样品融化，并将其在 LDH 储存缓冲液中稀释 (如果需要) 以便匹配试剂盒的线性范围。样品稀释的一般性建议如表 1 所示。

 确保样品平衡至室温 ( $22-25^{\circ}\text{C}$ )，然后再进行步骤 6 的操作。

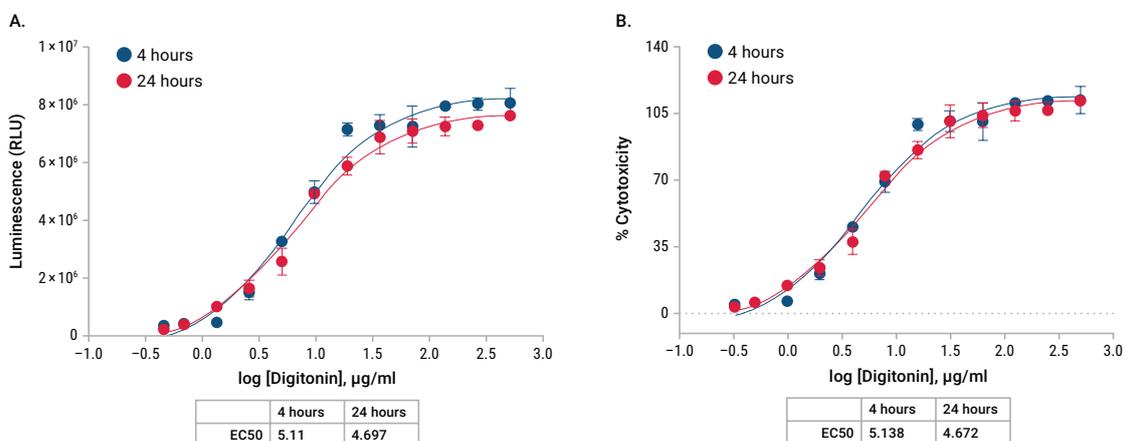
6. 将 50  $\mu\text{l}$  已稀释的样品转移至壁不透明的 96 孔板中（底部透明或不透明）。
7. 向每个孔加入 50  $\mu\text{l}$  的 LDH 检测试剂（配制方法如第 3.B 节所述）。
8. 室温 (22-25 $^{\circ}\text{C}$ ) 孵育 60 分钟。



**注意：**在添加 LDH 检测试剂 30-60 分钟后，记录发光信号。为了确保各种酶偶联反应达到平衡，不建议在加入试剂后 30 分钟内读数。孵育时间超过 60 分钟会增加检测的灵敏度，但请务必确保检测结果仍在线性范围内，且发光信号在持续增强。

9. 记录发光信号（参见第 3.F 节）。
10. 如果需要，可计算细胞毒性百分比（% 细胞毒性）：

$$\text{细胞毒性 \%} = 100 \times \frac{(\text{实验组 LDH 释放} - \text{培养基背景})}{(\text{最大 LDH 释放对照} - \text{培养基背景})}$$



**图 4. 通过从同一孔中重复取样检测细胞毒性。**将生长于 100  $\mu\text{l}$  无血清 F12 培养基中的 20000 个 A549 细胞用浓度不断增加的洋地黄皂苷 (digitonin) 处理。在 4 小时和 24 小时这两个时间点，从上述相同孔中分别取出 5  $\mu\text{l}$  样品，按 1:20 的比率稀释于 LDH 储存缓冲液中后冻存。融化样品，将其再稀释 2 倍，然后取 50  $\mu\text{l}$  稀释后的样品与 50  $\mu\text{l}$  LDH 检测试剂混匀。室温孵育 60 分钟后记录发光信号。**A.** 针对 digitonin 浓度绘制的相对发光单位 (RLU) 值。**B.** 使用上面的公式计算细胞毒性百分比，并相对于 digitonin 浓度作图。RLU = Relative Luminescence Units (相对发光单位)。

#### 4.C. LDH 阳性对照

LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay 中包含一个 LDH 阳性对照（从兔肌肉中纯化出的乳酸脱氢酶），可用于验证系统中其他组分的性能，确定检测的线性范围，或用作比较多个微孔板或多次实验之间的数据的归一化因子。LDH 滴定曲线的实例如图 5 所示。

1. 使用 275  $\mu\text{l}$  的 LDH 储存缓冲液溶解乳酸脱氢酶，配制成 1000 U/ml 的 LDH 标准品。轻轻混匀，直至溶解，然后将溶液置于冰上。为避免多次冻融循环，将 LDH 标准品分装成小份儿并在  $-20^{\circ}\text{C}$  以下存储。
2. 将 10  $\mu\text{l}$  的 LDH 标准品加入到 3.115 ml 的 LDH 储存缓冲液中，使 1000 U/ml 的 LDH 标准品稀释至 3.2 U/ml。
3. 使用 12 通道的试剂槽，按下表所示将 3.2 U/ml 的 LDH 标准品进一步稀释至 32 mU/ml，然后进行连续稀释。

| 稀释编号 ( # ) | LDH 的体积 ( $\mu\text{l}$ )                          | LDH 储存缓冲液的体积 ( $\mu\text{l}$ ) | mU/ml |
|------------|----------------------------------------------------|--------------------------------|-------|
| 1          | 10 $\mu\text{l}$ 的 3.2 U/ml 标准品<br>(第 4.C 节, 步骤 2) | 990                            | 32    |
| 2          | 500 $\mu\text{l}$ 的 # 1 稀释液                        | 500                            | 16    |
| 3          | 500 $\mu\text{l}$ 的 # 2 稀释液                        | 500                            | 8     |
| 4          | 500 $\mu\text{l}$ 的 # 3 稀释液                        | 500                            | 4     |
| 5          | 500 $\mu\text{l}$ 的 # 4 稀释液                        | 500                            | 2     |
| 6          | 500 $\mu\text{l}$ 的 # 5 稀释液                        | 500                            | 1     |
| 7          | 500 $\mu\text{l}$ 的 # 6 稀释液                        | 500                            | 0.5   |
| 8          | 0                                                  | 500                            | 0     |

4. 从每个 LDH 标准品稀释液 ( # 1-8 ) 中分别取三份 50  $\mu\text{l}$  的溶液，转移到 96 孔检测板的相应复孔中。板的剩余孔可用作样品孔。

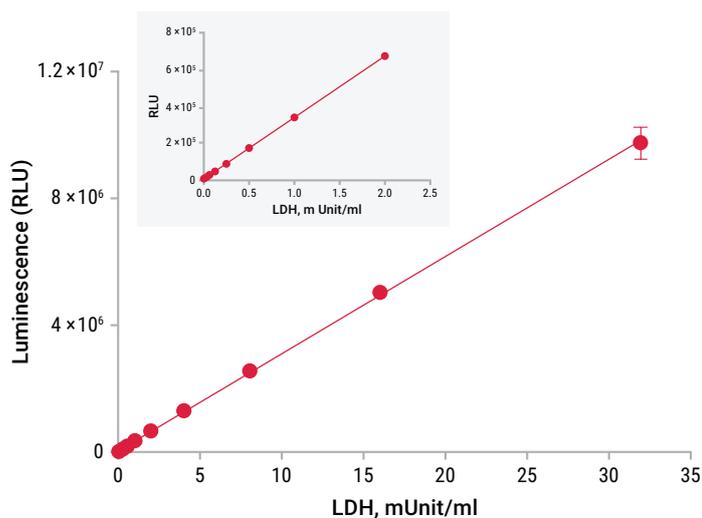
**注意：**如果需要，可仅用最高和最低稀释度溶液 ( # 1 和 # 8 稀释液 ) 作为阳性对照标准品。

5. 按照第 3.B 节的描述配制 LDH 检测试剂并将其转移到试剂槽中。
6. 使用多通道移液器，将 50  $\mu\text{l}$  配好的 LDH 检测试剂加入含有 LDH 标准品的 96 孔检测板的每个孔中。
7. 室温孵育 60 分钟。

## 8. 记录发光信号。

**注意：**为了确定样品的相对发光单位 (RLU) 值是否在检测的线性范围内，首先绘制 LDH 阳性对照标准曲线的 RLU 值，如图 5 所示。如果样品的 RLU 值落在 LDH 阳性对照标准曲线的线性范围内，那么样品值在本检测的线性范围内。如果样品值超出了 LDH 阳性对照标准曲线的线性范围，则应调整样品稀释方案。由于 RLU 值取决于检测条件，因此样品 RLU 值只能与在同一次检测中产生的 LDH 阳性对照标准曲线中的 RLU 值进行比较。

**注意：**为了验证实验样品的 RLU 值是否在检测的线性范围内，实验样品和 LDH 阳性对照标准曲线对应的样品应使用相同的储存缓冲液进行制备，且在相同的微孔板中进行处理。



**图 5. LDH 阳性对照标准曲线的线性范围。**将在 LDH 储存缓冲液中稀释的 LDH 阳性对照与 LDH 检测试剂等体积组合，并在室温温育 1 小时。使用 GloMax<sup>®</sup> 仪器记录发光信号。这些值代表三个重复样品的平均值 ± 标准差。RLU = 相对发光单位。

## 5. 注意事项

### 5.A. 细胞培养基和血清

LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay 可以兼容不同的培养基配方。检测灵敏度高，可支持将培养基中的样品稀释 5-300 倍，从而可最大限度减少培养基成分对检测反应的潜在影响。

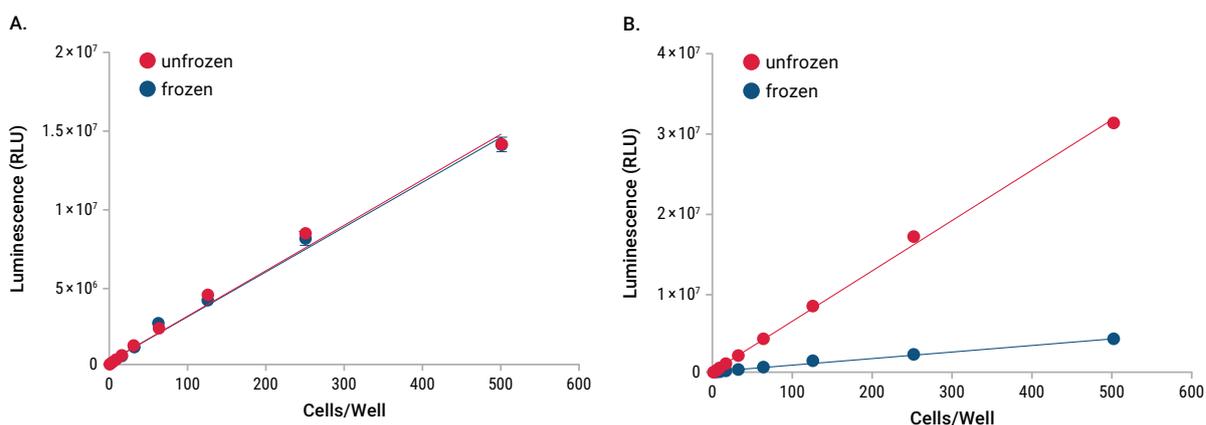
组织培养基中添加的动物血清可能包含相当量的 LDH，从而会增加背景发光，降低灵敏度。培养基中血清的存在不影响使用小样本体积时 LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay 的检测能力，也不会对冷冻样品和稀释后样品随着时间变化的检测产生影响。

使用血清含量更低或无血清的培养基，可以减少或消除背景发光。还可通过使用阴性对照来校正背景发光，以确定在没有细胞存在的情况下来自培养基中的血清的发光。由该对照确定的发光值可用于归一化从其它样品获得的发光值。请确保阴性对照的处理方式与实验样品的处理方式相同。例如，如果实验样品在检测前已经用 LDH 储存缓冲液稀释了 100 倍，那么阴性对照样品也应使用相同的缓冲液稀释 100 倍。

## 5.B. LDH 在培养基中和在冷冻状态下的稳定性

为了评估从细胞中释放的 LDH 在冷冻后的稳定性，我们比较了裂解的细胞在冷冻前后的滴定曲线。如图 6 中的 A 图所示，当裂解的细胞在 LDH 储存缓冲液中冷冻时，未观察到 LDH 活性的显著下降。但是，如果将细胞裂解物在添加了 1% BSA（牛血清蛋白）的 PBS 中稀释和冷冻时，LDH 的活性则下降了 85%（图 6，B）。

为检验培养基中的死细胞释放出的 LDH 在 37°C 的稳定性，我们测定了细胞裂解后 LDH 在不同时间点的活性。我们的数据表明 LDH 的活性并没有随着时间的推移而出现明显的损失（至少 72 个小时内；未显示数据）。



**图 6. LDH 在冷冻状态下的稳定性。**将起始浓度为  $0.2 \times 10^6$  个细胞/ml 的 A549 细胞裂解并在培养基中按 1:20 的比例稀释至 10000 个细胞/ml。然后，使用 LDH 储存缓冲液（A 图）或 PBS+1% BSA（B 图）将细胞再稀释两倍。将 50  $\mu$ l 稀释后的样品与 50  $\mu$ l 制备好的 LDH 检测试剂混匀，室温孵育 60 分钟后记录发光信号，测得 LDH 的活性。样品立即检测（未冷冻 unfrozen），或者在一次冻融循环后（冷冻 frozen）检测。RLU = 相对发光单位。

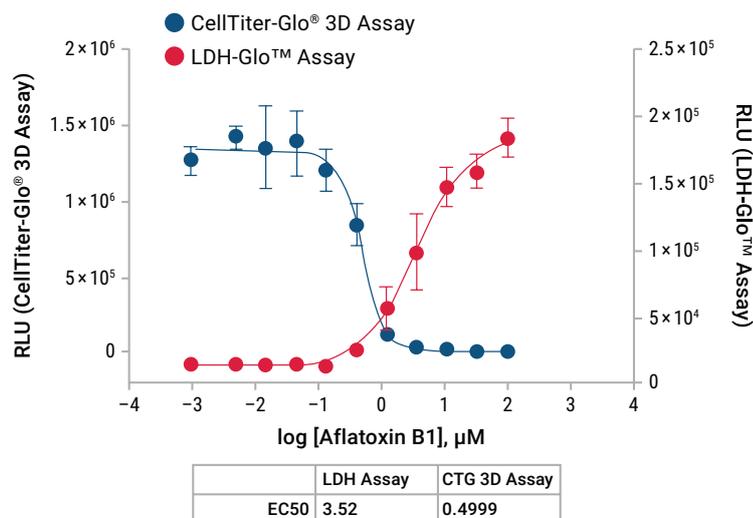
### 5.C. 使用终止液以获得稳定的发光信号

如需稳定的发光信号（例如，当需要同时处理多块板时），则可在添加了 LDH 检测试剂之后的任何时间里，通过添加还原酶抑制剂（如 menadione [ 甲萘醌 ]）使发光信号停止增加。添加甲萘醌可以阻止萤光素的持续生成，并允许在稍后的时间读取平板。发光信号可在 1-2 个小时内保持稳定。可以将甲萘醌（例如，Sigma 公司，目录号 M5625）配制成 40mM 的 DMSO（二甲基亚砷）储备溶液，并将其加入到样品中至终浓度为 0.25 mM。如需了解关于检测时间、最佳检测灵敏度和线性度的信息，请参阅第 3 节。

### 5.D. 与活力检测或其它检测试剂盒联合使用

LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay 可与细胞活力检测试剂盒进行多重联用，包括 Promega 的 RealTime-Glo™ MT、CellTiter-Glo® 和 CellTiter-Fluor™ 检测试剂盒。在将培养基样品移除用于 LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay 检测后，可按照 RealTime-Glo™ MT、CellTiter-Fluor™ 或 CellTiter-Glo® 检测试剂盒提供的方案，将剩余的样品进行相应的活力检测。多重检测可能有利于确认细胞健康的变化，或者鉴别出某次处理具有细胞抑制作用亦或是细胞毒性作用。

LDH-Glo™ 检测的非破坏性质使其能够与其它终点法检测试剂一起用于细胞健康（包括代谢）的正交测量。例如，剩余的细胞和培养基可用于测定 Caspase 活性（Caspase-Glo® 3/7 检测试剂盒）或代谢物水平的变化（Glucose-Glo™ 或 Glutamate-Glo™ 检测试剂盒）。

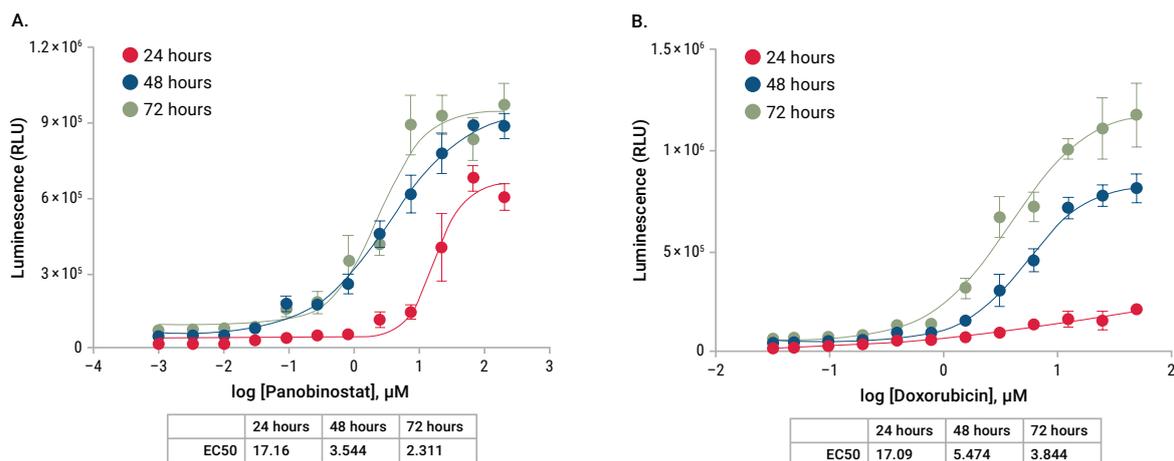


**图 7. LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay 和 CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay 的联合使用。**用黄曲霉毒素 B1 (Aflatoxin B1) 处理人体肝脏微组织 48 小时。将样品 (10μl) 以 1: 2.5 稀释度收集在 PBS 中，然后再进一步稀释 10 倍。处理期间毒性的变化使用 LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay 测定，具体方法是将 15 μl 稀释后的样品与 15 μl LDH 检测试剂混匀，室温孵育 60 分钟后记录发光信号。移取出样品进行 LDH 测定后，将等体积的 CellTiter-Glo® 3D 试剂添加到剩余的微组织样品中以评估细胞活力。RLU = 相对发光单位。

## 6. 附录

### 6.A. 检测球状体 (spheroid) 培养物中时间依赖性的细胞毒性

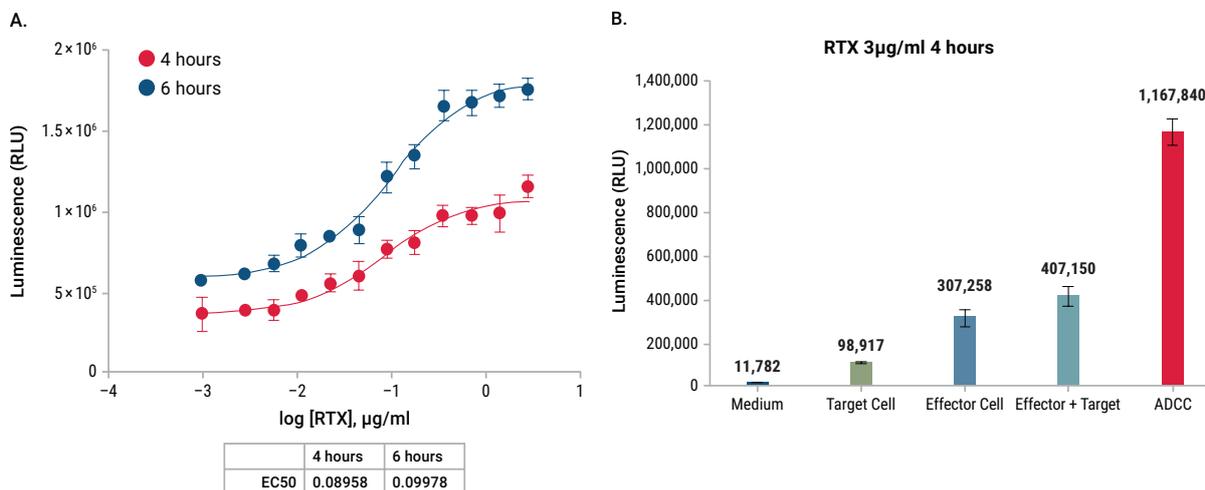
LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay 非常适合使用少量细胞检测膜受损细胞中释放出的 LDH。在此我们展示了使用该检测系统测定在 Corning® 384 孔超低吸附微孔板中形成的 HCT-116 球状体 (spheroid) 中药物诱导产生的细胞毒性的实例。通过从相同孔中重复取样进行时间依赖性的毒性测定。在使用 LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay 进行检测之前, 按第 4.B 节所述冻存样品。



**图 8. 来自相同样品孔的时间依赖性的细胞毒性。** 在 Corning384 孔超低吸附微孔板的每个孔中都接种 2500 个细胞, 使其形成 HCT116 球状体 (spheroid), 然后用帕比司他 (Panobinostat) (A 图) 或阿霉素 (Doxorubicin) (B 图) 处理。在指定的时间点, 从相同的孔中收集 2.5 μl 样品, 并以 1:10 的稀释度将样品稀释并冻存在 LDH 储存缓冲液中。将样品融化并进一步稀释 2.5 倍, 然后使用 LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay 测定 LDH 水平。RLU = 相对发光单位。

### 6.B. 在 ADCC 实验中检测细胞特异性的细胞毒性

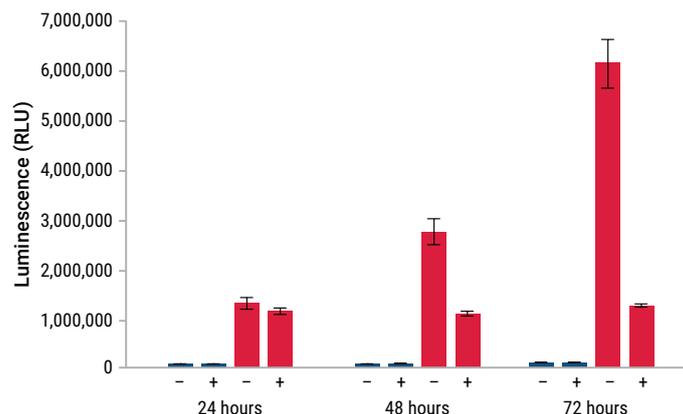
LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay 可用于测定在抗体依赖性细胞介导的细胞毒性作用 (ADCC) 研究中从膜受损的靶细胞释放到细胞培养基中的 LDH 活性。图 8 中的 ADCC 实例证明 LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay 可用于检测利妥昔单抗 ( rituximab ) 介导的靶细胞杀伤。EC<sub>50</sub> 值与利妥昔单抗相关的文献 (1) 中报道的数值一致。



**图 9. ADCC 示例。**按照效应细胞（外周血单核细胞 [PBMC]）：靶细胞 (Daudi)=20:1 的比率，将细胞铺板，并用不同浓度的利妥昔单抗（RTX），三复孔，处理细胞 4 或 6 小时。从相同孔中移出培养基样品 (2.5 µl)，用 LDH 储存缓冲液 (47.5 µl) 稀释并冷冻。取 25µl 融化后的样品加入等体积的 LDH 检测试剂中，室温孵育 60 分钟后记录发光信号。**A.** 将利妥昔单抗浓度相对于 RLU 作图，使用四参数 (4PL) 拟合曲线计算 EC<sub>50</sub>。**B.** 来自对照孔的 RLU 值（在与利妥昔单抗处理组相同的板上进行）显示靶细胞或效应细胞单独存在时发光信号很低，并且加入利妥昔单抗是细胞杀伤所必需的。ADCC = 效应细胞 + 靶细胞 + 利妥昔单抗 (RTX)。RLU = 相对发光单位。

### 6.C. 评估细胞数量和细胞增殖

乳酸脱氢酶是一种胞浆蛋白，大量存在于多种细胞的细胞质中。LDH 活性与孔中细胞的数量直接相关，可以用于定量细胞在增殖期间的数量变化，或用作测定孔中细胞总数的归一化因子。孔中存在的细胞数量与发光值成正比，而后者代表的是 LDH 活性。此外，通过测量释放到培养基中的 LDH 的含量，并且与 LDH 总量的变化进行比较，可以鉴定和表征影响细胞增殖的药物。具体实例如图 10 所示。用二甲双胍处理细胞后，未检测到释放到培养基中的 LDH 量有明显增加（蓝柱）。对照组样品中的总 LDH 量随着时间的增加而增加，但二甲双胍处理组样品中的总 LDH 量不随时间延长而变化。这些数据表明二甲双胍会抑制细胞增殖，但不会使细胞裂解。



**图 10. 检测细胞增殖。**96 孔板每孔接种 2,500 个 A549 细胞，在不加 (-) 或加入 (+) 10mM 二甲双胍 (metformin) 的条件下培养 24、48 或 72 小时。在每个时间点移出 5 $\mu$ l 培养基上清样品，稀释到 95 $\mu$ l LDH 储存缓冲液中并冻存，用于检测从细胞内释放到培养基中的 LDH (蓝色柱形)。细胞样品加入 Triton X-100 孵育 10 分钟，用同样的方式收集样品并冻存，用于检测细胞中总的 LDH 释放 (红色柱形)。将所有样品融化，用 LDH 储存缓冲液进一步稀释 5 倍，加入等体积 (50 $\mu$ l) 的 LDH 检测试剂，室温孵育 60 分钟后记录发光信号。RLU= 相对发光单位。

## 6.D. 参考文献

1. Tada, M. et al. (2014) Development of a Cell-Based Assay Measuring the Activation of FcRIIa for the Characterization of Therapeutic Monoclonal Antibodies. PLoS ONE 94(4), e95787. Doi:10.1371/journal.pone.0095787

## 6.E. 相关产品

### 细胞活力检测产品

| 产品                                    | 规格           | 目录号   |
|---------------------------------------|--------------|-------|
| RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay | 100 次反应      | G9711 |
|                                       | 10 × 100 次反应 | G9712 |
|                                       | 1,000 次反应    | G9713 |
| CellTiter-Glo® 3D Assay               | 10 ml        | G9681 |
|                                       | 10 × 10 ml   | G9682 |
|                                       | 100 ml       | G9683 |
| CellTiter-Glo® 2.0 Assay              | 10 ml        | G9241 |
|                                       | 100 ml       | G9242 |
|                                       | 500 ml       | G9243 |
| CellTox™ Green Cytotoxicity Assay     | 10 ml        | G8741 |
|                                       | 50 ml        | G8742 |
|                                       | 100 ml       | G8743 |

### 细胞凋亡检测产品

| 产品                                         | 规格         | 目录号    |
|--------------------------------------------|------------|--------|
| RealTime-Glo™ Apoptosis and Necrosis Assay | 100 次反应    | JA1011 |
|                                            | 1,000 次反应  | JA1012 |
| Caspase-Glo® 3/7 Assay                     | 2.5 ml     | G8090  |
|                                            | 10 ml      | G8091  |
|                                            | 10 × 10 ml | G8093  |
|                                            | 100 ml     | G8092  |

## 能量代谢检测产品

| 产品                             | 规格    | 目录号   |
|--------------------------------|-------|-------|
| Glucose Uptake-Glo™ Assay      | 5 ml  | J1341 |
| Glucose-Glo™ Assay             | 5 ml  | J6021 |
| Glutamate-Glo™ Assay           | 5 ml  | J7021 |
| Glutamine/Glutamate-Glo™ Assay | 5 ml  | J8021 |
| Lactate-Glo™ Assay             | 5 ml  | J5021 |
| NAD(P)H-Glo™ Detection System  | 10 ml | G9061 |
| NAD/NADH-Glo™ Assay            | 10 ml | G9071 |
| NADP/NADPH-Glo™ Assay          | 10 ml | G9081 |
| Mitochondrial ToxGlo™ Assay    | 10 ml | G8000 |

可提供其它规格。

## 发光检测仪和多功能读板仪

| 产品                                       | 目录号    |
|------------------------------------------|--------|
| GloMax® Navigator Microplate Luminometer | GM2000 |
| GloMax® Discover System                  | GM3000 |
| GloMax® Explorer System                  | GM3500 |

© 2018 Promega Corporation. All Rights Reserved.

Caspase-Glo, CellTiter-Glo, and GloMax are registered trademarks of Promega Corporation. CellTiter-Fluor, CellTox, Glucose Uptake-Glo, Glucose-Glo, Glutamate-Glo, Lactate-Glo, LDH-Glo and RealTime-Glo are trademarks of Promega Corporation.

Corning and Costar are registered trademarks of Corning, Inc.

Products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations. Please visit our Web site for more information.

All prices and specifications are subject to change without prior notice.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.