

For Research Use Only. Not For Use In Diagnostic Procedures

Version 3.0

LDH基质液

LDH matrix Solution

Do not eat Store at -20° C & in the dark



Cat.No. MGL1552

Size : 100 mL

Technical literature is available at: www.mesgenbio.com.E-mail MesGen Technical Services if you have questions on use of this system: tech@mesgenbio.com

产品原理

活细胞的胞浆内含有LDH。正常情况下，LDH不能透过细胞膜，当细胞受到NK细胞的杀伤后，LDH释放到细胞外。LDH可使乳酸脱氢酶，进而使NAD还原成NADH，后者再经递氢体吩嗪二甲酯硫酸盐（PMS）还原碘硝基氯化四氮唑（INT），INT接受H⁺被还原成紫红色甲月赞类化合物。在酶标仪上用490nm比色测定。

产品组成

Reaction buffer	30mL	-20°C
Solution I	25mL	-20°C, 避光保存
Solution II	10mL	-20°C, 避光保存
Solution III	10mL	-20°C, 避光保存
Solution IV	25mL	-20°C, 避光保存

LDH基质液配制（配制后建议2小时内尽快使用）

使用前，将各个组分置于室温融化，按照比例 Reaction buffer : Solution I : Solution II : Solution III : Solution IV = 6:5:2:2:5 混合即得 LDH 基质液。(以 96 孔板测试 20 个孔样为例:取 Reaction buffer 600μL、Solution I 500μL、Solution II 200μL、Solution III 200μL、Solution IV 500μL，所得总体积 2mL)

实验步骤

1、靶细胞的传代（YAC-1细胞为例）

实验前24h将靶细胞进行传代培养。应用前以Hank's液洗3次，用RPMI1640完全培养液调整细胞浓度为 4×10^5 个/mL。

2、脾细胞悬液的制备（效应细胞）

无菌取脾，置于盛有适量无菌Hank's液小平皿中，用镊子轻轻将脾磨碎，制成单细胞悬液。经200目筛网过滤，或用4层纱布将脾磨碎，或用Hank's液洗2次，每次离心10min（1000r/min）。

弃上清将细胞浆弹起，加入0.5mL灭菌水20秒，裂解红细胞后再加入0.5mL 2倍Hank's液及8mL Hank's液，1000rpm，10min离心，用1mL含10%FBS的RPMI1640完全培养液重悬，用1%冰醋酸稀释后计数（活细胞数应在95%以上），用台酚兰染色计数活细胞数（应在95%以上），最后用RPMI1640完全培养液调整细胞浓度为 2×10^7 个/mL。

3、NK细胞活性检测

取靶细胞和效应细胞各100μL（效靶比50:1），加入96孔培养板中；靶细胞自然释放孔加靶细胞和培养液各100μL，靶细胞最大释放孔加靶细胞和2.5% Triton X-100各100μL；上述各项均设三个复孔，37°C、5%CO₂培养箱中培养4h，然后将96孔培养板以1500r/min离心5min，每孔吸取上清100μL置96孔培养板中，同时加入LDH基质液100μL，反应3-30min（以实验为准），每孔加1mol/L的HCl 30μL，在酶标仪490nm处测定光密度值（OD）。

按下式计算NK细胞活性，受试样品组的NK细胞活性显著高于对照组的NK细胞活性，即可判定该项实验结果阳性。

$$\text{NK细胞活性 (\%)} = \frac{\text{反应孔OD} - \text{自然释放孔OD}}{\text{最大释放孔OD} - \text{自然释放孔OD}} \times 100\%$$

数据处理及结果判定

NK细胞活性需进行数据转换, $X = \sin^{-1} P$, 式中P为NK细胞活性, 用小数表示, 然后再进行方差分析, 在进行方差分析时, 需按方差分析的程序先进行方差齐性检验, 方差齐, 计算F值, $F < F_{0.05}$, 结论: 各组均数间差异无显著性; $F \geq F_{0.05}$, $P \leq 0.05$, 用多个实验组和一个对照组间均数的两两比较方法进行统计; 对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换, 待满足正态或方差齐要求后, 用转换后的数据进行统计; 若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的, 改用秩和检验进行统计。

注意事项

- 1、靶细胞和效应细胞必须新鲜, 细胞存活率应大于95%。
- 2、比色时环境温度应保持恒定。
- 3、在一定范围内, NK细胞活性与效靶比值成正比。一般效靶比值不应超过100。

产品保存

-20°C、避光, 有效期6个月。

产品仅供科学研究 禁止用于临床诊断、治疗

For Research Use Only. Not For Use In Diagnostic
Procedures