

LDH基质液

产品货号: T10819

产品规格: 100ml

产品简介:

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可使乳酸锂脱氢，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:

产品名称	规格	保存条件
LDH基质液	100ml	-20℃，避光

操作步骤:

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。Hank's 液洗3次，用RPMI 1640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RPMI 1640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℃、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:

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

保存条件: -20℃，避光保存，有效期3个月。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com