

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°C, 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), 用台盼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100 μ L(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100 μ L, 靶细胞最大释放孔加靶细胞和2.5%Triton X-100各100 μ L; 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100 μ L置96孔培养板中, 同时加入LDH基质液100 μ L, 反应3-30min(以实验为准), 每孔加1mol/L的HCl 30 μ L, 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, $X = \text{Sin}^{-1} P$, 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; $F \geq F_{0.05}$, $P < 0.05$, 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°C, 避光保存, 有效期3个月。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com