

# LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS J2380 and J2381

この Quick Protocol は LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay の簡易型のプロトコルです。  
最新、詳細なプロトコルについては英語マニュアル TM548 をご覧ください。

## <用意するもの>

- ・ピペットマン・チップ
- ・1.5mL エッペンドルフチューブ
- ・PBS, 1%BSA もしくは LDH Storage Buffer (200mM Tris-HCl (pH 7.3), 10% Glycerol, 1% BSA)
- ・96well 白プレート (参考 : Corning, Cat. #3917(ソリッド))
- ・ルミノメーター
- ・Ice Box
- ・(Optional) Triton X-100
- ・(Optional) Menadione (e.g., Sigma Cat.# M5625)

## <試薬の準備 : LDH Detection Reagent> (用事調製)

1. LDH Detection Enzyme Mix と Reductase Substrate を室温にて解凍する。解凍後、LDH Detection Enzyme Mix は室温においておき、Reductase Substrate は氷中に置いておく。
2. 転倒混和やタッピングなどにて、軽く攪拌する。
3. 下記の表にしたがって、試薬を調製する。
4. 全ての試薬を加えた後、5回の転倒混和などを行い、よく混ぜる。

Component	Volume Per Reaction	x	Sample 数	= 合計
LDH Detection Enzyme Mix	50µl	x		
Reductase Substrate	0.25µl	x		
LDH Detection Reagent	50.25µl	x		

デットボリュームを考慮し、1-2 サンプル分多めに調製する事をお勧めします。

J2380 は 96well plate 200 アッセイ分、J2381 は 96well plate 1000 アッセイ分に相当します。

\* 未使用の LDH Detection Enzyme Mix は-65℃以下もしくは-20~-30℃にて保存可能です。また、未使用の Reductase Substrate は-65℃以下にて保存可能です。

\*\* LDH Detection Enzyme Mix と Reductase Substrate は 3 回以上の凍結融解を行わないでください。複数回の凍結融解を行う場合には、小分けに分注して保存してください。

\*\*\* **LDH Detection Reagent** は用事調製してください。**LDH Detection Reagent** の保存は推奨しません。

### <LDH Positive Control の調製>

1. キット付属の Lactate Dehydrogenase のバイアルに 275  $\mu\text{L}$  の LDH Storage Buffer を添加する。転倒混和などを行い攪拌し、溶解する。（\*final 1,000 U/ml の LDH Positive Control 溶液となります）
2. 複数回の凍結融解を避けるため、小分けに分注して $-20^{\circ}\text{C}$ にて保存する。

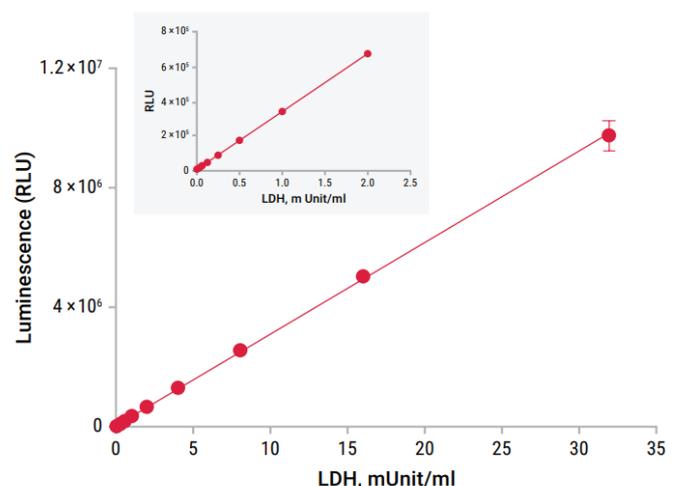
\*LDH Storage Buffer で調製した LDH Positive Control は 3 回まで凍結融解が可能です。  
 \*\*英語マニュアルは 0-32 mU/ml の条件で検量線を作成するプロトコルです。使用頻度に合わせて LDH Positive Control を分注し保管してください。

### <モデルプロトコル：LDH スタンダードカーブの作製>

1. 1,000 U/ml の LDH Positive Control 10 $\mu\text{L}$  を 3.115ml の LDH Storage Buffer で希釈する。（\*final 3.2 U/ml の溶液となります）
2. 下記の表に従い、LDH Positive Control の希釈系列を作製する。

Dilution #	Volume LDH ( $\mu\text{l}$ )	Volume LDH Storage Buffer ( $\mu\text{l}$ )	mU/ml
1	10 $\mu\text{l}$ of 3.2 U/ml	990	32
2	500 $\mu\text{l}$ from Dilution #1	500	16
3	500 $\mu\text{l}$ from Dilution #2	500	8
4	500 $\mu\text{l}$ from Dilution #3	500	4
5	500 $\mu\text{l}$ from Dilution #4	500	2
6	500 $\mu\text{l}$ from Dilution #5	500	1
7	500 $\mu\text{l}$ from Dilution #6	500	0.5
8	0	500	0

3. 上記 2. で作製した希釈系列 1-8 の溶液を白の 96well plate に移す。各溶液において 3 検体 (triplicate) 用意する。
4. 用事調製した LDH Detection Reagent を 50 $\mu\text{L}$  ずつ各 well に加える。
5. 室温で 60 分インキュベートする。
6. 発光測定を行い、スタンダードカーブを作成する。



**Figure 1**  
LDH positive control を用いたスタンダードカーブ

### <モデルプロトコル：Cytotoxicity Assay>

1. 任意の化合物等で処理し、細胞毒性を誘導した培養細胞サンプル・LDH の漏出が見られるサンプルなどを用意する。
2. 任意のタイミングにて、アッセイに使用する培地サンプル 2~5 uL を採取し、LDH Storage Buffer 48~95 uL にて希釈する。ピペティングを行い、よく混ぜる。
3. サンプルを保管し、すべてのタイミングのサンプルが集まった後にアッセイする場合には-20°Cに希釈したサンプルを保存する。すぐに測定する場合には4.に進む。
4. 2.で調製したサンプルを LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay のアッセイレンジ内に収まるように LDH Storage Buffer にて希釈する。
5. 希釈したサンプル 50 uL を 96well 白プレートに移す。
6. 用事調製した LDH Detection Reagent を 50uL ずつ各 well に加える。
7. 室温で 60 分インキュベートする。発光測定を行う。

### (その他の情報)

・LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay は細胞数や培地中の血清の影響で、バックグラウンドのシグナルが高く出る可能性があります(英語マニュアル Fig3. 参照)。

本実験の実施前に最適な細胞数、サンプルの希釈倍率をご検討ください。また、バックグラウンド測定用の well を用意してください。詳細な希釈倍率やバックグラウンドの情報は英語マニュアル 3.C. Assay Linearity and LDH Dilution Factor Recommendations などをご覧ください。

- ・キット付属の LDH Positive Control は rabbit muscle 由来の精製 LDH タンパクです。
- ・オプションの Triton X-100 は Maximum LDH Release Control の作製に利用します。詳細は英語マニュアル 4.A. Recommended Controls をご覧ください。

・LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay では発光反応が安定化するまでに 60 分のインキュベーション時間が必要です。

・インキュベーション時間を延ばすことで感度を上昇させることも可能です。発光値が測定レンジ外になってしまう場合には、オプションの Menadione を添加し、発光シグナルを安定化させてください。発光シグナルは 1-2 時間安定です。詳細は英語マニュアル 5.C. Use of Stop Solution to Achieve Steady Luminescent Signal をご覧ください。

・サンプル採取後、すぐに LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay を実施する場合には PBS, 1% BSA での希釈も可能です。ただ、この希釈サンプルを凍結保存すると、LDH 活性が顕著に低下します。サンプルを保存する場合には LDH Storage Buffer をご利用ください。詳細は英語マニュアル 5.B. LDH Stability in Media and Upon Freezing をご覧ください。

・LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay ではサンプルと試薬を 1:1 で混ぜることで最適な反応条件となります。サンプルや測定フォーマットに合わせて反応ボリュームを調整してください。