

本説明書の補足資料を小社 HP(www.dojindo.co.jp)にてご案内しています。小社 HP 中の商品検索に「CK12」と入力し、製品ページにアクセスいただき、ページ中の「補足資料」をご覧ください。

はじめに

Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST は、細胞から培地中に放出された乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性を測定することにより細胞傷害を測定するキットです。LDH は細胞質に存在する酵素で、通常は細胞質に留まっていますが、細胞膜が傷害を受けると培地中に放出されます。放出された LDH は安定なため、死細胞または細胞膜に傷害を受けた細胞数を測る指標として広く測定されています。LDH は、NAD (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド) を補酵素として乳酸の脱水素化を触媒し、ピルビン酸と NADH を生成します。次に、生じた NADH は、電子メディエーターを介してテトラゾリウム塩 (無色) をホルマゼン (橙色) に還元します。生成したホルマゼンの量は、放出された LDH 活性に比例するため、傷害を受けた細胞数の指標となります。

本キットは、生細胞と反応せず、かつ、細胞にダメージを与えないため、生細胞と死細胞が混在する細胞培養液中に直接試薬を加えても細胞傷害を測定することが可能です (ホモジニアスアッセイ)。また、細胞培養液を取り出して LDH 活性を測定することも可能です (ノンホモジニアスアッセイ)。安定性の高い試薬を用いているため、調製した溶液は長期間保存でき、用時調製する必要がありません。

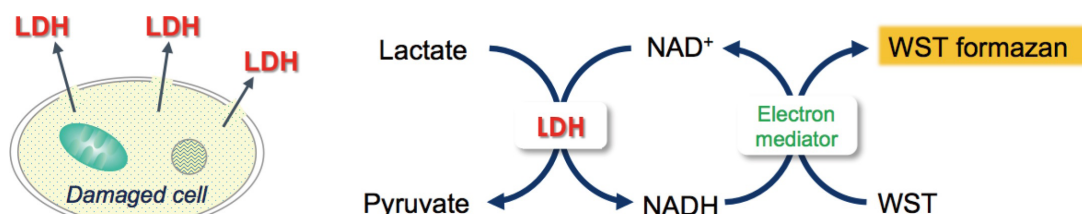
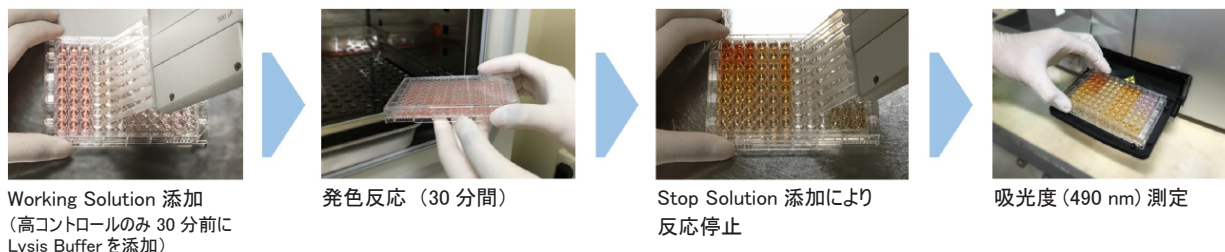


図 1 Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST を用いた細胞毒性の測定原理

測定の流れ



キット内容

	100 tests	500 tests	2000 tests
Dye Mixture	× 1	× 1	× 4
Assay Buffer	11 ml × 1	55 ml × 1	55 ml × 4
Lysis Buffer	1.1 ml × 1	5.5 ml × 1	5.5 ml × 4
Stop Solution	5.5 ml × 1	27.5 ml × 1	27.5 ml × 4

保存条件

0 ~ 5 °C にて保存してください。

必要なもの
(キット以外)

- CO₂ インキュベーター
- プレートリーダー (490 nm の吸光フィルター)
- 細胞培養用マイクロプレート
- 20, 200 µl マルチチャンネルピペット
- 測定用マイクロプレート (ノンホモジニアスアッセイのみ)

* ホモジニアスアッセイの場合、浮遊細胞も平底を使用します。ノンホモジニアスアッセイの場合、浮遊細胞は丸底または V 底を使用ください。

使用上のご注意

- 本キットにはガラス製容器およびアルミ製シールキャップを使用しております。取扱いに際しては、保護手袋などを着用いただくなど、ご注意ください。
- 細胞種毎で細胞内の LDH 量は異なります。初めて測定を行う際は、予備実験にて最適な細胞数をご確認ください。

溶液調製

Working Solution の調製

- 1) Dye Mixture に適量の Assay Buffer を加えて、転倒混和により内容物を完全に溶解する。
100 tests の場合 1 ml、500 tests の場合は 5 ml の Assay Buffer を加えると完全に溶解します。
- 2) 1) で調製した溶液全量を Assay Buffer のボトルに移して、転倒混和により混合する。
Working Solution 調製後は遮光下、0 ~ 5 °C で保存してください (6 ヶ月間安定)。

プロトコル
ホモジニアス
アッセイ

予備実験 (細胞数の最適化)

- 1) 細胞を培地で洗浄し、培地を用いて 5×10^5 cells/ml の細胞懸濁液を調製する。
- 2) 培地 100 µl を 96 穴マイクロプレートの各ウェルに加える。
- 3) マルチチャンネルピペットを用いて 2 倍希釈系列を調製する。高コントロール、低コントロール及びバックグランドコントロール (培地のみ) を各々 3 ウェルずつ準備する (図 2)。
* 1) の細胞懸濁液 100 µl をウェル (A 列) に加え、ピペッティングで混合する (2.5×10^4 cells/well)。100 µl を B 列のウェルに移して 2 倍に希釈する。この操作を繰り返して 2 倍希釈系列を作成する。
- 4) 37 °C の CO₂ インキュベーターでインキュベーションする。
* インキュベーションは実際の細胞毒性試験と同じ時間に合わせる。
- 5) 高コントロール用のウェルに Lysis Buffer 10 µl を加える。
- 6) 37 °C、30 分間 CO₂ インキュベーター内でインキュベーションする。
- 7) 全てのウェルに Working Solution 100 µl を加える。遮光下、室温で 30 分間呈色反応を行う。
- 8) 全てのウェルに Stop Solution 50 µl を加える。
- 9) プレートリーダーを用いて 490 nm の吸光度を測定する。
得られた吸光度を縦軸に、細胞数を横軸にプロットし、下記の点を考慮し最適な細胞数を決定することをお勧めします。
- 細胞数と吸光度でプロットし直線性があり、吸光度が 2.0 以下の細胞数を選択する。
- 高コントロールと低コントロールの吸光度差が 0.2 以上となる細胞数を選択する。

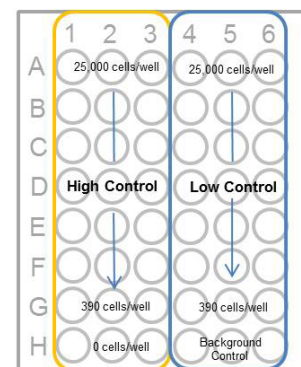


図 2 予備実験の配置例

細胞毒性試験

- 1) 平底 96 穴マイクロプレートに培地で調製した細胞懸濁液 50 μl を加える。
* 付着細胞の場合、細胞を一晩インキュベーションして、新しい培地 50 μl に交換した後に操作 2) へ進む。
- 2) 培地で目的の濃度に調製した被験物質溶液 50 μl を 1) の細胞懸濁液に加える (表 1)。
- 3) 37 $^{\circ}\text{C}$ で適切な時間 CO_2 インキュベーター内でインキュベーションする。
- 4) 高コントロールウェルに Lysis Buffer 10 μl を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間 CO_2 インキュベーター内でインキュベーションする。
- 5) 各ウェルに Working Solution 100 μl を加える。遮光下、室温で 30 分間呈色反応を行う。
- 6) 全てのウェルに Stop Solution 50 μl を加える。
- 7) プレートリーダーを用いて 490 nm の吸光度を測定する。

細胞毒性の算出式

被検物質と各コントロールの吸光度からバックグラウンドコントロールの吸光度を引いた値 (3 重測定の平均値) を用いて算出する。

$$\text{細胞傷害性 (\%)} = \frac{(A-C)}{(B-C)} \times 100$$

A: 被験物質
B: 高コントロール
C: 低コントロール

表 1 各ウェルの溶液量 (ホモジニアスアッセイ)

	実験サンプル	高コントロール	低コントロール	バックグラウンドコントロール
培地	-	50 μl	50 μl	100 μl
細胞懸濁液	50 μl	50 μl	50 μl	-
被験物質	50 μl	-	-	-
Lysis Buffer	-	10 μl	-	-

* 実験サンプルと高コントロールの液量の違いは測定結果に影響を与えません。

予備実験 (細胞数の最適化)

- 1) 細胞を培地で洗浄し、培地を用いて 5×10^5 cells/ml の細胞懸濁液を調製する。
- 2) 培地 100 μl を 96 穴マイクロプレートの各ウェルに加える。
- 3) マルチチャンネルピペットを用いて 2 倍希釈系列を調製する。高コントロール、低コントロール及びバックグラウンドコントロール (培地のみ) を各々 3 ウェルずつ準備する (図 2)。
* 1) の細胞懸濁液 100 μl をウェル (A 列) に加え、ピペティングで混合する (2.5×10^4 cells/well)。100 μl を B 列のウェルに移して 2 倍に希釈する。この操作を繰り返して 2 倍希釈系列を作成する。
- 4) 培地 100 μl を全てのウェルに加える。
- 5) 37 $^{\circ}\text{C}$ の CO_2 インキュベーターでインキュベーションする。
* インキュベーションは実際の細胞毒性試験と同じ時間に合わせる。
- 6) 高コントロール用のウェルに Lysis Buffer 20 μl を加える。
- 7) 37 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間 CO_2 インキュベーター内でインキュベーションする。
- 8) 250 $\times$ g、2 分間、マイクロプレートを遠心する。(浮遊細胞の場合)
- 9) 各ウェルから上清 100 μl を注意深く取り、測定用 96 穴マイクロプレートに移す。
- 10) 全てのウェルに Working Solution 100 μl を加える。遮光下、室温で 30 分間呈色反応を行う。
- 11) 全てのウェルに Stop Solution 50 μl を加える。
- 12) プレートリーダーを用いて 490 nm の吸光度を測定する。
得られた吸光度を縦軸に、細胞数を横軸にプロットし、下記の点を考慮し最適な細胞数を決定することをお勧めします。
- 細胞数と吸光度でプロットし直線性があり、吸光度が 2.0 以下の細胞数を選択する。
- 高コントロールと低コントロールの吸光度差が 0.2 以上となる細胞数を選択する。

細胞毒性試験

- 1) 96 穴マイクロプレートに培地で調製した細胞懸濁液 100 μl を加える。
* 付着細胞の場合、細胞を一晩インキュベーションして、新しい培地 100 μl に交換した後に操作 2) へ進む。
- 2) 培地で目的の濃度に調製した被験物質溶液 100 μl を 1) の細胞懸濁液に加える (表 2)。
- 3) 37 $^{\circ}\text{C}$ の CO_2 インキュベーターで適切な時間インキュベーションする。
- 4) 高コントロールウェルに Lysis Buffer 20 μl を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間 CO_2 インキュベーター内でインキュベーションする。
- 5) 250 $\times$ g、2 分間、マイクロプレートを遠心する。(浮遊細胞の場合)
- 6) 各ウェルから上清 100 μl を注意深く取り、測定用 96 穴マイクロプレートに移す。
- 7) 全てのウェルに Working Solution 100 μl を加える。遮光下、室温で 30 分間呈色反応を行う。
- 8) 全てのウェルに Stop Solution 50 μl を加える。
- 9) プレートリーダーを用いて 490 nm の吸光度を測定する。

表 2 各ウェルの溶液量 (ノンホモジニアスアッセイ)

	実験サンプル	高コントロール	低コントロール	バックグラウンドコントロール
培地	20 μl	100 μl	120 μl	220 μl
細胞懸濁液	100 μl	100 μl	100 μl	-
被験物質	100 μl	-	-	-
Lysis Buffer	-	20 μl	-	-

測定例

HeLa 細胞に対する Mitomycin C の細胞毒性試験

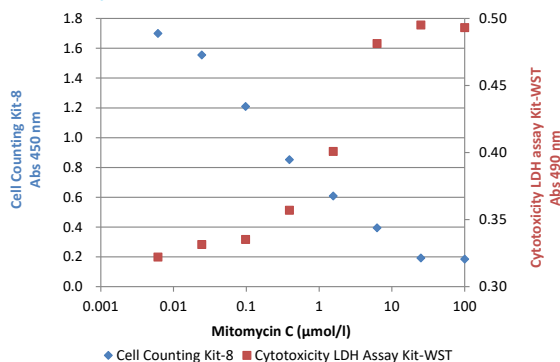


図 3 細胞毒性試験 (Mitomycin C)

Test substance: mitomycin C
Incubation: 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , 48 hours
Cell line: HeLa
Culture medium: MEM, 10% FBS

<開発元>

Dojindo Molecular Technologies, Inc.
30W Gude Dr, Suite 260, Rockville, Maryland, 20850 U.S.A.
Tel: +1-301-987-2667, Fax: +1-301-987-2687
URL: www.dojindo.com

<委託製造元>

株式会社 同仁化学研究所
熊本県上益城郡益城町田原 2025-5 〒861-2202
Tel: 096-286-1515 Fax: 096-286-1525 URL: www.dojindo.co.jp/
ドージン・イースト (東京) Tel: 03-3578-9651 Fax: 03-3578-9650