

<For Research Use Only> Code No. 299-50601 (960 Tests)

for Cytotoxicity Assay

LDH-Cytotoxic Test *Wako*

■ Intended use

LDH-Cytotoxic Test *Wako* is used for the quantitative determination of cell death by measuring the LDH activity liberated from cells with cell membrane injuries.

■ Introduction

LDH-Cytotoxic Test *Wako* is a test kit for the determination of toxicity of various drugs, which utilizes the culture cells. LDH (lactate dehydrogenase) activity liberated from the cells with lysed cell membrane by drugs are determined with this kit. By using this kit, an objective measurement of toxicity can be made at a lower cost and with a simpler procedure compared to toxicity tests with experimental animals.

Furthermore, not only the natural cytotoxicity, following items concerning cell membrane injury can be measured as well.

1. Bioreactive substance (TNF and lymphotoxin, *etc.*) dependent cell injury.
2. Cell-mediated immunity (T-cells and macrophage, *etc.*) dependent cell injury.
3. Complement-dependent cell injury (Cytotoxin, *etc.*).
4. Antibody-dependent cell injury (Phagocytosis and K-cells, *etc.*).

This kit can also be used for the determination of survival rate of the cells.

■ Kit Contents

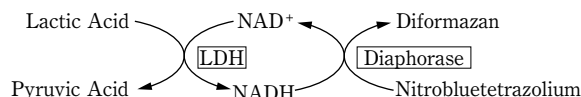
- | | | | |
|--------------|-----------------------------|-------------|------------------|
| 1. 296-50611 | Color Reagent | for 5 mL | 10 bottles |
| | · Nitrotetrazolium Blue | 3.7 mg/vial | |
| | · Diaphorase | | |
| | · NADH | | |
| 2. 293-50621 | Buffer Solution | 55 mL | 1 bottle |
| | · DL-Lithium lactate | 50 mg/mL | |
| 3. 290-50631 | Stop Solution | 55 mL | 1 bottle |
| | · 1 mol/L Hydrochloric acid | | |
| 4. 293-50641 | Microplates | | 10 plates |
| | | 96 wells | (Not sterilized) |

■ Characteristics

1. Measurement of alive cells not only dead cells is possible.
2. Highly sensitive determination of toxicity is possible by the direct measurement of dead cells.
3. Enzymatic measurement provides a quantitative determination of cell membrane injury with a high precision.
4. The detection sensitivity can be controlled by modifying the time for sample treatment or coloring reaction.
5. Because the culture supernatant is used as a specimen, there is no loss of the cells which enables prospective follow up of bioactivities.
6. Sterilized procedure is not necessary because of the short time procedure.

■ Principle of the method

LDH catalyzes the conversion of lactate to pyruvate in the presence of NAD. In the reaction lactate is oxidized to pyruvate and an equivalent amount of NAD is reduced to NADH. The NADH formed reduces nitrotetrazolium blue in the presence of diaphorase to produce purple-blue diformazan. The absorbance of this dye is measured at 560 nm (± 10 nm).



■ Detailed procedure

1. Materials required but not supplied

Medium
Cells
Sample
Phosphate buffered saline (PBS)
Sterilized 96 well microplate (for incubation):
for preparation of a Cell Plate and a Sample Plate
Tween 20
Centrifuge (with a rotor for microplate)
Dispenser (multichannel pipettes)
Microplate reader capable of reading absorbance at 560 $\pm$ 10 nm

2. Preparation of a Cell Plate

First, 96 well microplate with cells for sample treatment is prepared.

<Suspended cells>

- (1) Take cells into a centrifuge tube and centrifuge for 5 minutes at 1,000 rpm.
- (2) Remove the supernatant, suspend the cells in PBS, and centrifuge for 5 minutes at 1,000 rpm.
- (3) Remove the supernatant, dilute the cells to get a concentration of 1×10^5 cells/mL, and dispense 50 μ L of suspension into each well of the microplate (5,000 cells/well).
* Take care that a homogeneous suspension is dispensed into the well.
- (4) Use the plate prepared here as a Cell Plate for suspended cells.

<Adherent cells>

- (1) Take cells into a centrifuge tube and centrifuge for 5 minutes at 1,000 rpm.
- (2) Remove the supernatant, suspend the cells in the media, and centrifuge for 5 minutes at 1,000 rpm.
- (3) Remove the supernatant, dilute the cells to get a concentration of 1×10^5 cells/mL, and dispense 50 μ L of suspension into each well of the microplate (5,000 cells/well).
* Take care that a homogeneous suspension is dispensed into the well.
- (4) Incubate the plate with cells in 5% CO₂ incubator overnight at 37°C.
- (5) Remove the medium, wash twice with 100 μ L of PBS, and dispense 50 μ L of PBS into each well.
- (6) Use the plate prepared here as a Cell Plate for adherent cells.

3. Preparation of a Sample Plate

A 96 well microplate as a Sample Plate is prepared here before Sample Treatment.

The following procedure helps efficient dispensing of the sample into the Cell Plate using multichannel pipettes.

<Preparation of samples>

(1) Sample (S)

Prepare the samples of various concentrations diluted with PBS. Because samples are diluted by 2 (1 + 1) when sample treatment is made, prepare the samples with double concentration of the final concentration to be checked.

(2) Negative Control (NC)

Use PBS as a specimen for Negative Control.

(3) Positive Control (PC)

Use 0.2% Tween 20 dissolved in the PBS as a specimen for positive Control.

<Example of sample location>

All the samples with different concentration, Negative Control, and Positive Control should be located in the same positions as used for sample treatment.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		S	S	S	S	S	S	S	NC	NC	NC	
C		S	S	S	S	S	S	S	PC	PC	PC	
D												

4. Sample Treatment

(1) Dispensation of the samples

Transfer 50 μ L of each sample (including NC and PC) from Sample Plate to the respective well in the Cell Plate.

(2) Sample treatment

After dispensing the sample in (1), allow the plate to stand for 15 minutes at room temperature.

* Use the most suitable treatment condition for the experiment (e.g., usage of CO₂ incubator at 37°C, etc.). Detection sensitivity can be variable by changing the time for sample treatment.

(3) Mix the plate moderately.

(4) Centrifuge the plate for 3 minutes at 1,000 rpm.

(5) Take 50 μ L of supernatant from each well of the Sample Plate, dispense it into the plate included in the kit (Reaction Plate).

* Take care not to suck the cells when taking the supernatant.

5. Preparation of Coloring Solution

Dissolve the whole contents of Color Reagent with 5.0 mL of Buffer Solution and use this solution as Coloring Solution.

* One vial of Color Reagent is for use with one 96 well plate.

6. Coloring reaction

Dispense 50 μ L of Coloring Solution into the wells which contain supernatant from Sample Plate and allow it to stand for 45 minutes at room temperature.

* Detection sensitivity can be variable by changing the reaction time in this step.

7. Dilution of Stop Solution

Dilute the Stop Solution with the same volume of distilled or deionized water (1 + 1) and use this solution as Diluted Stop Solution.

8. Termination of coloring reaction

Dispense 100 μ L of diluted (1 + 1, with distilled or deionized water) Stop Solution into each well.

9. Measurement

Measure the absorbance of reaction mixture by a microplate reader at 560 $\pm$ 10 nm within 90 minutes after termination of coloring reaction.

* In the case that the absorbance for Positive Control exceeds 1.4, shorten the time for coloring reaction or dilute the supernatant obtained in step (5) of "4. Sample treatment" so that the absorbance of Positive Control becomes below 1.4.

10. Data analysis

Cell injury rate is calculated by using the following equation.

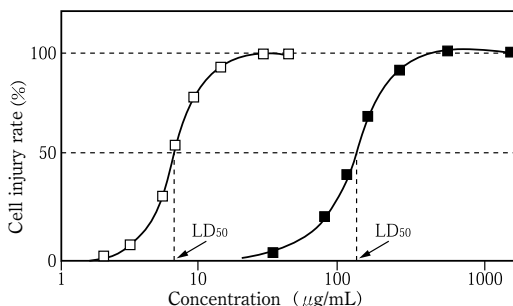
$$\text{Cell injury rate (\%)} = \frac{(S - N)}{(P - N)} \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

S: Absorbance of the sample

N: Absorbance of Negative Control

P: Absorbance of Positive Control

Prepare a graph similar to the one shown below by plotting the cell injury rate (ordinate) against sample concentration (abscissa) and determine LD₅₀ value. The LD₅₀ is defined as the sample concentration where the cell injury rate is 50%.



11. Correction of the results

LDH activity cannot accurately be measured when the sample contains some factor which influences the LDH activity is necessary.

When the sample inhibits or enhances the LDH activity, a correction should be made in the measurement of LDH activity (Coloring reaction). LDH solution prepared from the cell by the means like freezing and thawing of the cell is used to correct the LDH activity. Following absorbances are to be measured in the coloring reaction.

Cell injury rate is calculated by using the following equation.

$$\text{Cell injury rate (\%)} = \frac{(S'-N)}{(P-N)} \times 100 \dots\dots\dots(1)'$$

A: Absorbance obtained by the coloring reaction using LDH solution and sample with respective concentration as specimen.

B: Absorbance obtained by the coloring reaction using LDH solution and PBS.

In the case the sample is influentially colored, absorbance (C) for each sample obtained by the coloring reaction using PBS instead of color reagent should be deducted from S in equation (1) or (2).

■ Limitations of the procedure

- (1) Keep all the reagents under the specified conditions and do not use the reagent past the expiration date stated on each reagent container label.
- (2) Take care that the sample is not adhered to the side wall of the microplate and mix it well with Coloring Solution.
- (3) Colored reaction mixture after the addition of Reaction Terminator is stable for 3 hours under a light protection.
- (4) The Stop Solution contains 1N HCl and should be handled with a due caution.

■ Storage condition and expiry date

- (1) Storage: Keep at 2~10℃ in a dark place.
- (2) Expiry: Indicated on the label.

■ References

1. Korzeniewski, C. and Callewaert, D.M. An Enzyme-release Assay for Natural Cytotoxicity., *J. Immunol. Methods*, **64**: 313-320 (1983).
2. Decker, T. and Lohmann-Matthes, M.-L. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity., *J. Immunol. Methods*, **15**: 61-69 (1988).

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
 Telephone : + 81-6-6203-3741
 Facsimile : + 81-6-6201-5964
<http://ffwk.fujifilm.co.jp>

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation

1600 Bellwood Road
 Richmond, VA 23237
 U.S.A.
 Telephone : + 1-804-271-7677
 Facsimile : + 1-804-271-7791
<http://www.wakousa.com>

FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH

Fuggerstrasse 12
 D-41468 Neuss
 Germany
 Telephone : + 49-2131-3111-0
 Facsimile : + 49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>

細胞毒性測定用 LDH-細胞毒性テストウォー 使用説明書

〔はじめに〕

本試薬は、培養細胞を用いて、各種薬剤の毒性を簡便に測定するためのキットです。薬剤により細胞膜に障害を受けた細胞から遊離した LDH（乳酸脱水素酵素）活性を測定します。実験動物を用いた毒性試験に比較して、安価で手間がかからず、客観的に毒性を測定することが可能です。

また、本試験は毒性試験のほか、細胞膜破壊に関連する以下のような項目の測定に利用することができます。

- 1) 生理活性物質による細胞障害
- 2) 細胞性免疫による細胞障害
- 3) 補体依存性細胞障害
- 4) 抗体依存性細胞障害

これらのほか、細胞の生存率の測定にも利用できます。

〔内容〕

	成 分 名	包 装 内 容
発 色 試 薬	ニトロブルーテトラゾリウム (3.7mg/vial), ジアホラーゼ, NAD	5mL用×10本
緩 衝 液	DL-乳酸リチウム (50mg/mL)	55mL×1本
反応停止液	塩酸 (1mol/L)	55mL×1本
96穴マイクロプレート	—————	10枚(非滅菌)

〔使用目的〕

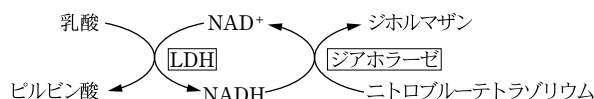
細胞膜に障害を受けた細胞から遊離される LDH 活性を測定することによって、細胞毒性を定量的に測定することを目的として使用します。

〔特徴〕

- 1) 死細胞だけでなく生細胞の測定も可能です。
- 2) 死細胞を直接測定することにより、毒性等の高感度測定が可能です。
- 3) 酵素測定法のため、細胞毒性を定量的に精度良く測定することが可能です。
- 4) 検体処理時間や発色反応時間を変えることにより、感度調節が可能です。
- 5) 測定時間が短いため、無菌的に測定する必要がありません。

〔測定原理〕

LDH の作用により乳酸がピルビン酸に酸化されると同時に、補酵素 NAD は NADH に還元されます。サンプル中の LDH 活性に比例して生成される NADH はジアホラーゼの酵素作用でニトロブルーテトラゾリウムを還元して青紫色のジホルマザンを生成します。この呈色液の 560nm (±10nm) の吸光度を測定します。



〔使用方法〕

1) 準備すべき器具、試薬

培養液
細胞
PBS
組織培養用96穴マイクロプレート（滅菌済）
：細胞プレート作成用及び検体プレート作成用
Tween20
遠心機（マイクロプレート用ローター）
分注器（8連マイクロピペッターなど）
マイクロプレートリーダー（560±10nm フィルター）

2) 細胞プレートの作成

まず最初に検体処理を行う細胞が入った組織培養用96穴マイクロプレートを作成します。

＜浮遊細胞の場合＞

- (1) 細胞を遠心管にとり、1000rpm で5分間遠心します。
 - (2) 上清を除き、PBSに懸濁して、1000rpm で5分間遠心します。
 - (3) 上清を除き、 1×10^5 (cells/mL) になるようにPBSで細胞を希釈し、プレートの各ウェルに50 μ L ずつ分注します (5000 cells/well)。
- ◆細胞を分注する時は、懸濁状態が常に均一になるよう注意して下さい。

＜付着細胞の場合＞

- (1) 細胞を遠心管にとり、1000rpm で5分間遠心します。
 - (2) 上清を除き、培養液に懸濁して1000rpm で5分間遠心します。
 - (3) 上清を除き、 1×10^5 (cells/mL) になるように培養液で細胞を希釈し、プレートの各ウェルに50 μ L ずつ分注します (5000 cells/well)。
- ◆細胞を分注する時は、懸濁状態が常に均一になるよう注意して下さい。
- (4) 細胞プレートを一晚37℃、5%CO₂インキュベータで保温します。
 - (5) 古い培養液を捨て、PBS100 μ L で2回洗浄し、最後に50 μ L のPBSを各ウェルに分注します。

3) 検体プレートの作成

ここでは、検体処理の準備として、検体が入った組織培養用96穴マイクロプレートを作成します。こうしておくことにより、マルチチャンネルピペッターなどを用いて、多数の検体を効率よく細胞プレートへ分注することができます。

＜検体の調製＞

(1) 検体 (S)

検体をPBSで各種濃度に希釈したものを使用します。ただし、検体処理時に検体は2倍に希釈されることになるので、検体調製時は 最終濃度の2倍 になるようにしてください。

(2) ネガティブコントロール (NC)

PBSを使用します。

(3) ポジティブコントロール (PC)

PBSで溶解した0.2% Tween20を使用します。

＜各種検体の配置例＞

検体処理を行う配置になるように組織培養用96穴マイクロプレートへ各濃度検体およびネガティブコントロール、ポジティブコントロールを分注します。

	0.005	0.01	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	← 検体濃度 (%)					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													
B		S	S	S	S	S	S	S	NC	NC	NC		
C		S	S	S	S	S	S	S	PC	PC	PC		
D													

4) 検体処理

(1) 検体の分注

8連マイクロピペッターなどを用いて、検体プレートから細胞プレートへ50 μ Lずつ分注します。

(2) 検体処理

(1)の各液を入れた後、15分間室温で放置します。37℃のCO₂インキュベーターで放置するなど実験に適した検体処理条件を用いてください。また、ここでの検体処理時間を変えることにより、検出感度を調節することが可能です。

(3) 軽くプレートを攪拌します。

(4) プレートを1000rpmで3分間遠心します。

(5) 検体処理したプレートの各ウェルから上清を50 μ Lとり、キットに付属の新しいプレート（反応プレート）に移します。

- ◆上清をとるときには、細胞を吸い込まないように、十分に注意してください。

5) 発色液の調製

発色試薬1バイアルに緩衝液5.0 mLを加え、溶解します。発色試薬1バイアルは96穴マイクロプレート1枚用です。

6) 発色反応の開始

検体処理液上清が入っている反応プレートに発色液50 μ Lを分注して 室温で45分間 放置します。ここでの反応時間を変えることにより、検出感度を調節することが可能です。

7) 発色反応の停止

反応停止液の 2倍希釈液 100 μ Lを各ウェルに分注し、発色反応を停止します。

8) 測定

反応停止後90分以内に、マイクロプレートリーダーにより 560±10nm の吸光度を測定します。

- ◆ポジティブコントロールの吸光度が1.4を越える場合には、反応時間を短くするか、あるいは「4) 検体処理」の(5)の段階で上清の希釈を行うなどして吸光度が1.4以下になるように調節してください。

9) データの解析

以下に示す計算式(1)により細胞障害率を求めます。

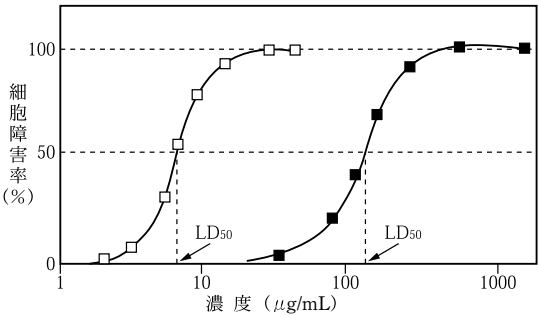
$$\text{細胞障害率 (\%)} = \frac{(S - N)}{(P - N)} \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

S=検体での吸光度

N=ネガティブコントロールでの吸光度

P=ポジティブコントロールでの吸光度

求めた細胞障害率を縦軸に、被検物質の濃度を横軸にとってプロットし、グラフから細胞障害率が50%に相当する濃度を読み取り、その値をLD₅₀値とします(下図参照)。



テカン社マイクロプレートリーダーを用いて測定する場合、LS-PLATEmanagerの使用により、LD₅₀値を求めることができます(「関連機材」の項参照)。

10) 測定値の補正について

検体にLDH活性に影響を及ぼす因子が含まれている場合や検体液が着色している場合には正確なLDH活性を測定できません。このような場合には、LDH活性測定値(計算式(1)のS)を補正する必要があります。以下に、補正方法の一例を示します。

阻害(または促進)の程度を補正する場合は、細胞の凍結融解などにより細胞から調製したLDH酵素液を用います。LDH酵素液に各濃度検体を添加した試料について発色反応処理を行ったときの吸光度(A)と、検体の代わりにPBSを添加した試料について発色反応処理を行ったときの吸光度(B)をそれぞれ測定し、Sの補正值 $S' = S \times (B/A)$ を算出し、計算式(1)のSに置き換えて細胞障害率を求めます(計算式(1)')。

$$\text{細胞障害率 (\%)} = \frac{(S'-N)}{(P-N)} \times 100 \quad \cdots \cdots (1)'$$

また、検体が着色している場合は、Sの値から各濃度検体の吸光度(C)を差し引いて補正を行います。

〔使用上または取り扱い上の留意点〕

- (1) 試薬は指定された保存条件で保管し、使用期限を過ぎたものは使用しないで下さい。
- (2) 試料がマイクロプレート側壁に付着したままにならないように注意し、発色液とよく混合して下さい。
- (3) 反応停止液には1 mol/L塩酸を使用していますので、取り扱いには十分注意して下さい。

〔貯法・使用期限〕

- (1) 貯 法 : 2～10℃ 遮光保存
- (2) 使用期限 : ラベルに記載

〔関連機材〕

- ・テカン社マイクロプレートリーダー

〔参考文献〕

- 1) Korzeniewski, C. and Callewaert, D. M. : *J. Immunol. Methods*, **64**, 313 (1983).
- 2) Decker, T. and Lohmann-Matthes, M.-L. : *J. Immunol. Methods*, **115**, 61 (1988).

本キットは診断用には使用できません。

製造発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社

大阪市中央区道修町三丁目1番2号

Tel : 06-6203-3741

2308KA2