

はじめに

Cell Counting Kit-F (CCK-F) は Calcein-AM (3',6'-Di(O-acetyl)-4',5'-bis[*N,N*-bis(carboxymethyl) aminomethyl] fluorescein, tetraacetoxymethyl ester) を用いた、簡単で高感度な細胞増殖、細胞毒性測定キットです。Calcein-AM は生細胞に取り込まれ、細胞内エステラーゼにより酵素的に加水分解されて、Calcein となり強い黄緑色蛍光 ($\lambda_{ex}=490$ nm, $\lambda_{em}=515$ nm) を発します。生じた Calcein の蛍光値は生細胞数に比例します (図 1)。また、CCK-F は [3 H]-チミジン取り込み法のようなラジオアイソトープや、MTT 法のような細胞溶解操作を必要とせず、使用する上で特別な手技もありません。そのため、再現性の良い正確な結果を得ることができます。

キット内容

- Calcein-AM DMSO solution 110 μ l \times 1

キット以外に必要なもの

- 蛍光マイクロプレートリーダー
励起フィルター : 480 ~ 500 nm, 蛍光フィルター : 500 ~ 535 nm
- 蛍光測定用 (ブラック、又はホホワイト) 96-well マイクロプレート

保存

-20°C で保存して下さい。ご購入後、未開封で 6 ヶ月安定です。
残った溶液はキャップをしっかりと締め、-20°C で保存して下さい。

溶液調製

所要量の Calcein-AM DMSO solution を PBS(-) で 50 倍に希釈し、CCK-F 希釈溶液を調製する。希釈は使用直前にいき、希釈後は直ぐに使用する。

細胞毒性試験

1. 細胞を 50,000 cells/ml となるように計数し、96-well マイクロタイタープレートの各ウェルに 100 μ l ずつ播種する (5,000 cells/well)。
2. 炭酸ガスインキュベーター内で 24 時間前培養する。
3. 目的の濃度に調製した被験物質を各ウェルに 10 μ l ずつ添加する。
4. 炭酸ガスインキュベーター内で 48 時間培養する。
5. 細胞を剥がさぬように培地のみを吸引除去する。(浮遊細胞の場合はマイクロプレート用遠心分離機を使用して細胞を沈殿させ、培地を除去する。)
6. 各ウェルに PBS(-) を 100 μ l ずつ加え、先と同様に吸引除去して細胞を洗浄し、再度 PBS(-) を 100 μ l ずつ加える。
7. CCK-F 希釈溶液を各ウェルに 10 μ l ずつ添加する。
8. 室温で 15 分 ~ 30 分発色させる。
9. 蛍光プレートリーダーで蛍光を測定する。($\lambda_{ex}=490$ nm, $\lambda_{em}=515$ nm 付近)

IC₅₀ の求め方

下記式により細胞生存率を算出する。被験物質濃度に対して細胞生存率をプロットし、生存率が 50% となる薬剤濃度を IC₅₀ とする。

$$\text{細胞生存率 (\%)} = [(A_c - A_b) / (A_s - A_b)] \times 100$$

A_s : サンプルの蛍光強度 (細胞 + 被験物質 + CCK-F 希釈溶液)

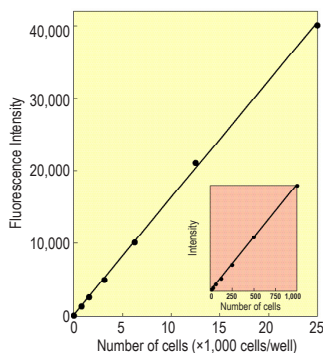
A_c : 陰性対照の蛍光強度 (細胞 + CCK-F 希釈溶液、被験物質無し)

A_b : ブランク蛍光強度 (培地 + CCK-F 希釈溶液、細胞無し)

HL60 細胞を用いて、Mytomycin C (MMC) と Sodium dodecylsulfate (SDS) の細胞毒性試験を行った例を図 3 に示す。

注意事項

1. 培地中のフェノールレッドと血清は測定を妨害しますので、CCK-F 希釈溶液を加える前に PBS(-) や、血清やフェノールレッドを含まない培地に置換してください。
2. 被験物質は培地や PBS(-)、生理食塩水など細胞にダメージを与えない溶液で溶解、希釈してください。
陰性対照とブランクのウェルには、被験物質の代わりに被験物質溶解に用いた溶液を加えてください。
3. 24-well や 6-well のプレートを用いる場合、緩衝液 (培地) の 1/10 量の CCK-F 希釈溶液を各ウェル添加してください。



使用細胞 : HL60
呈色反応 : 30 分
測定波長 : $\lambda_{ex}=485$ nm, $\lambda_{em}=535$ nm

図 1 細胞数と蛍光強度の関係

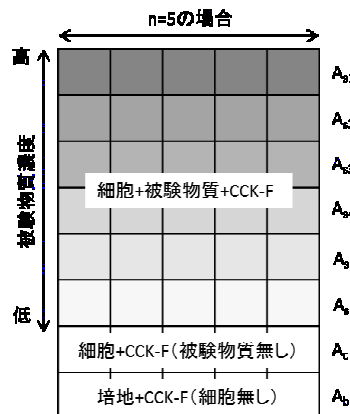
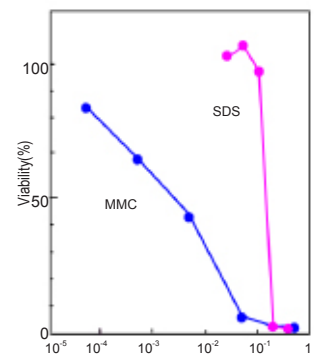


図 2 プレートレイアウト例



使用細胞 : HL60
使用薬剤 : Mitomycin C (MMC), Sodium dodecylsulfate (SDS)
薬剤処理 : 37°C, 5% CO₂, 48 時間
呈色反応 : 30 分
Detection : $\lambda_{ex}=485$ nm, $\lambda_{em}=535$ nm

図 3 細胞毒性試験

ご質問・ご要望は下記までお問い合わせください。

DOJINDO 株式会社同仁化学研究所
熊本県上益城郡益城町町原 2025-5
熊本テクノリサーチパーク 〒861-2202
Tel: 096-286-1515 (代表) Fax: 096-286-1525
E-mail: info@dojindo.co.jp URL: www.dojindo.co.jp

ドージン・イースト (東京)
東京都港区芝大門 2-1-17 朝川ビル 7F 〒105-0012
Tel: 03-3578-9651 (代表) Fax: 03-3578-9650
フリーダイヤル : 0120-489548
フリーファックス : 0120-021557

CK06: Cell Counting Kit-F
Revised February 16, 2016