

Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST

Supporting manual for antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity assay

はじめに

本説明書は、Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST を用いた抗体依存性細胞傷害測定用 (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: ADCC) です。本製品のキット内容や Working Solution の調製方法に関して、製品添付の取扱説明書も合わせてご覧ください。

正確な測定のために

細胞の種類によって LDH 活性が異なるため、ターゲット細胞の種類を変える場合には、抗体依存性細胞傷害測定を行う前に右図の順番に従ってターゲット細胞数の最適化を行ってください。

ターゲット細胞数の最適化

抗体依存性細胞傷害測定

測定方法の選択

実験条件に応じて「ホモジニアス測定」または「ノンホモジニアス測定」を選択し、各測定方法の手順に従ってください。ホモジニアス測定は 1 ページ、ノンホモジニアス測定は 4 ページを参照してください。

ホモジニアス測定

ターゲット細胞数の最適化

- 1) ターゲット細胞を培地で洗浄後、培地を用いて 5×10^5 cells/ml のターゲット細胞懸濁液を調製する。
- 2) 培地 100 μ l を 96 穴マイクロプレートの各ウェルに加える。
- 3) 96 穴マイクロプレート A 行のウェル (高コントロール用 :TMR および低コントロール用 :TSR の各々 3 ウェル) に操作 1) のターゲット細胞懸濁液 100 μ l を加え、ピペッティングで混合する (2.5×10^4 cells/well)。A 行のウェル中の細胞懸濁液 100 μ l を B 行のウェルに移し、2 倍希釈する。この操作を繰り返して 2 倍希釈系列を作成する。(図 1)

TMR (Target Maximum Release, 高コントロール):

ターゲット細胞に Lysis Buffer を加えて、全ての細胞から放出される LDH 活性を測定する。

TSR (Target Spontaneous Release, 低コントロール):

ターゲット細胞には培地以外加えず、細胞から自発的に放出される LDH 活性を測定する。

CMB (Culture Medium Background, バックグラウンドコントロール):

ターゲット細胞を含まない培地中の血清成分に由来する LDH 活性を測定する。

	1	2	4	5	TSR	7	8
A		25,000 cells/well		25,000 cells/well			
B		12,500 cells/well		12,500 cells/well			
C		6,250 cells/well		6,250 cells/well			
D		3,125 cells/well		3,125 cells/well			
E		1,563 cells/well		1,563 cells/well			
F		781 cells/well		781 cells/well			
G		391 cells/well		391 cells/well			
H	CMB	0 cells/well					

図 1 プレート配置例

- 4) 37 °C の CO₂ インキュベーターで静置する。
* インキュベーション時間は実際の抗体依存性細胞傷害測定と同じ時間に合わせてください。
- 5) 高コントロール (TMR) の各ウェルに Lysis Buffer 10 μ l を加える。
- 6) 37 °C の CO₂ インキュベーターで 30 分間静置する。
- 7) 全てのウェルに Working Solution 100 μ l を加える。遮光下、室温で 30 分間呈色反応を行なう。
* ターゲット細胞の種類で呈色状況が異なるため、呈色の程度に応じて呈色反応時間を調整してください。
- 8) 全てのウェルに Stop Solution 50 μ l 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。
- 10) 以下の①~③のいずれかの条件を満たすようなウェル当たりのターゲット細胞数を設定する。

① TMR と TSR の吸光度の差が CMB の値の 2 倍以上

$$(\text{OD 値}^{\text{TMR}} - \text{OD 値}^{\text{TSR}}) \geq 2 \times \text{OD 値}^{\text{CMB}}$$

② TMR と TSR の吸光度の差が最大

③ TMR の吸光度 (OD 値^{TMR}) が 1.0 以上 3.0 以下

測定に使用する抗体を培地で任意の倍率で希釈し、10種類の濃度の抗体溶液を作成する(抗体濃度=0を含む)。

プレート配置例(図2)と各ウェルの液量(表1)を参照してください。

ウェルの種類

ER (Experimental Release) : 各濃度の抗体溶液、エフェクター細胞およびターゲット細胞混合時に放出される LDH

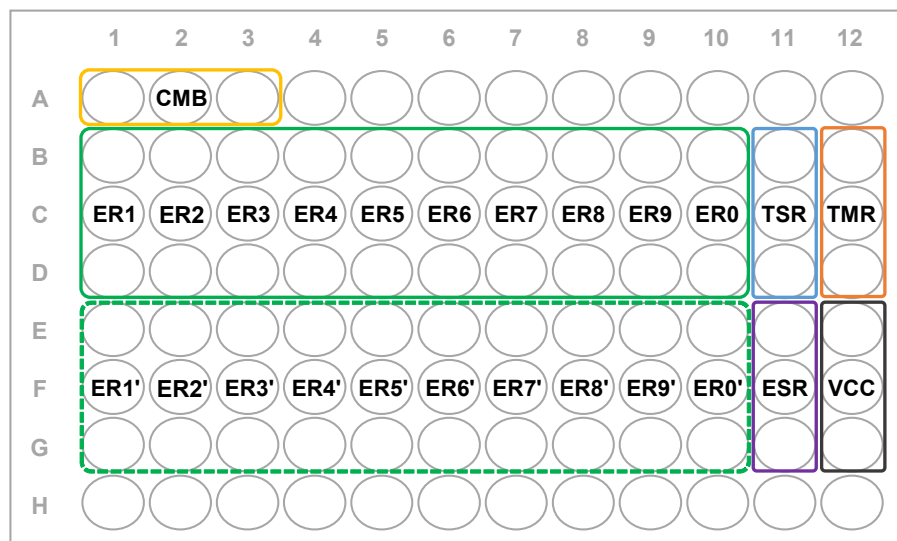
ESR (Effector Spontaneous Release) : エフェクター細胞が自発的に放出する LDH

TSR (Target Spontaneous Release) : ターゲット細胞が自発的に放出する LDH

TMR (Target Maximum Release) : ターゲット細胞に Lysis Buffer を加え、全ての細胞から放出される LDH

CMB (Culture Medium Background) : 培地中に含まれる LDH

VCC (Volume Correction Control) : 培地中に Lysis Buffer を添加した時の LDH、体積補正に用いる



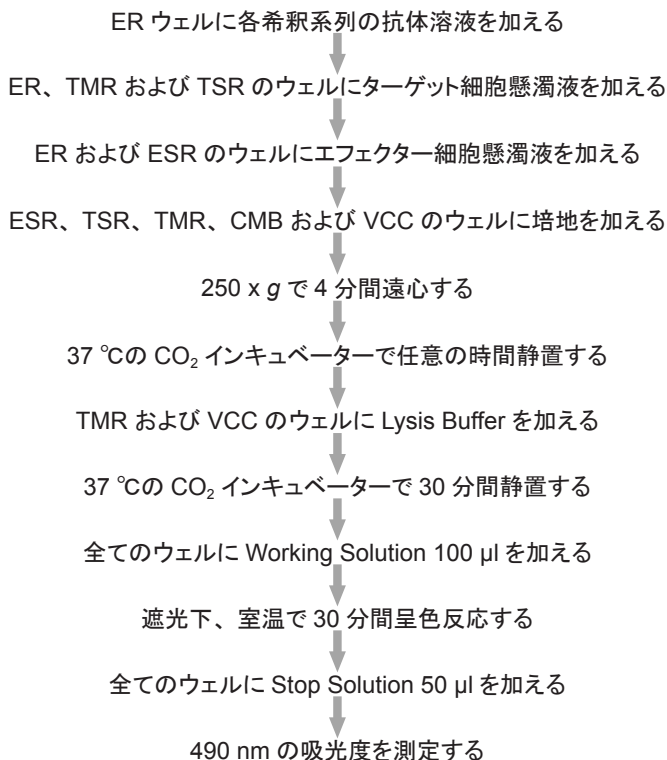
ER' のウェルは異なる種類の被検物質として使用することができます。
A 及び H 行には CMB 以外で使用するウェルにも培地を入れておくことをお勧めします。

図 2 プレート配置例

表 1 各ウェルの液量 (ホモジニアス測定)

	ER	ESR	TSR	TMR	CMB	VCC
被検物質(抗体溶液)	25 µl	-	-	-	-	-
培地	-	50 µl	75 µl	75 µl	100 µl	100 µl
エフェクター細胞懸濁液	50 µl	50 µl	-	-	-	-
ターゲット細胞懸濁液	25 µl	-	25 µl	25 µl	-	-
Lysis Buffer	-	-	-	10 µl	-	10 µl

測定手順



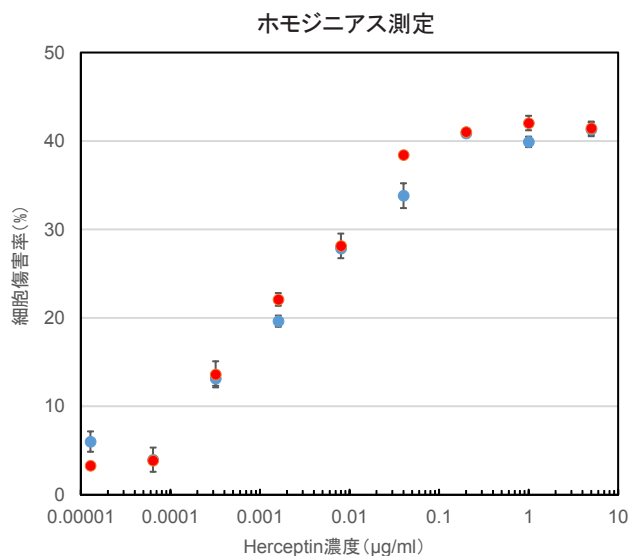
細胞傷害性の算出

- 1) ER、ESR、TSR ウェルの吸光度から CMB の吸光度の値を引く。
- 2) TMR の吸光度から VCC の吸光度の値を引く。
- 3) 以下の式を用いて各被検物質濃度における細胞毒性 (%) を算出する。

$$\text{細胞毒性 (\%)} = \frac{ER - ESR - TSR}{TMR - TSR} \times 100$$

ER: OD 値^{ER} - OD 値^{CMB}
ESR: OD 値^{ESR} - OD 値^{CMB}
TSR: OD 値^{TSR} - OD 値^{CMB}
TMR: OD 値^{TMR} - OD 値^{VCC}

測定例 本キットを用いた Herceptin モノクローナル抗体による抗体依存性細胞傷害測定の実施例



*同一条件で2回測定 (赤色、青色)

被検物質: Herceptin
ターゲット細胞 (T細胞): SK-BR-3 (1x10⁴ cells/well)
エフェクター細胞 (E細胞): PBMC (1x10⁵ cells/well)
使用培地: RPMI1640 (2% FBS, 1% Antibiotic-antimimetic)
E細胞およびT細胞比率: 10:1

- 1) ターゲット細胞を培地で洗浄後、培地を用いて 5×10^5 cells/ml のターゲット細胞懸濁液を調製する。
- 2) 培地 100 μ l を 96 穴マイクロプレートの各ウェルに加える。
- 3) 96 穴マイクロプレート A 行のウェル（高コントロール用 :TMR および低コントロール用 :TSR の各々 3 ウェル）に操作 1) のターゲット細胞懸濁液 100 μ l を加え、ピペティングで混合する (2.5×10^4 cells/well)。A 行のウェル中の細胞懸濁液 100 μ l を B 行のウェルに移し、2 倍希釈する。この操作を繰り返して 2 倍希釈系列を作成する。(図 3)

TMR (Target Maximum Release, 高コントロール):
ターゲット細胞に Lysis Buffer を加えて、全ての細胞から放出される LDH 活性を測定する。

TSR (Target Spontaneous Release, 低コントロール):
ターゲット細胞には培地以外加えず、細胞から自発的に放出される LDH 活性を測定する。

CMB (Culture Medium Background, バックグラウンドコントロール):
ターゲット細胞を含まない培地中の血清成分に由来する LDH 活性を測定する。

	1	2	4	5	7	8
A		25,000 cells/well		25,000 cells/well		
B		12,500 cells/well		12,500 cells/well		
C		6,250 cells/well		6,250 cells/well		
D		3,125 cells/well		3,125 cells/well		
E		1,563 cells/well		1,563 cells/well		
F		781 cells/well		781 cells/well		
G		391 cells/well		391 cells/well		
H	CMB	0 cells/well				

図 3 プレート配置例

- 4) 培地 100 μ l を全てのウェルに加える。
- 5) 37 $^{\circ}$ C の CO₂ インキュベーターで静置する。
* インキュベーション時間は実際の抗体依存性細胞傷害測定と同じ時間に合わせてください。
- 6) 高コントロール (TMR) の各ウェルに Lysis Buffer 20 μ l を加える。
- 7) 37 $^{\circ}$ C の CO₂ インキュベーターで 30 分間静置する。
- 8) 250 x g で 4 分間マイクロプレートを遠心する。
- 9) 各ウェルから上清 100 μ l 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 μ l を加える。遮光下、室温で 30 分間呈色反応を行なう。
* ターゲット細胞の種類で呈色状況が異なるため、呈色の程度に応じて呈色反応時間を調整してください。
- 11) 全てのウェルに Stop Solution 50 μ l 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。
- 13) 以下の①～③のいずれかの条件を満たすようなウェル当たりのターゲット細胞数を設定する。

① TMR と TSR の吸光度の差が CMB の値の 2 倍以上

$$(\text{OD 値}^{\text{TMR}} - \text{OD 値}^{\text{TSR}}) \geq 2 \times \text{OD 値}^{\text{CMB}}$$

② TMR と TSR の吸光度の差が最大

③ TMR の吸光度 (OD 値^{TMR}) が 1.0 以上 3.0 以下

抗体溶液の調製

測定に使用する抗体を培地で任意の倍率で希釈し、10 種類の濃度の抗体溶液を作成する (抗体濃度 = 0 を含む)。

抗体依存性細胞傷害 測定 (ADCC)

プレート配置例 (図 4) と各ウェルの液量 (表 2) を参照してください。

ウェルの種類

ER (Experimental Release) : 各濃度の抗体溶液、エフェクター細胞およびターゲット細胞混合時に放出される LDH

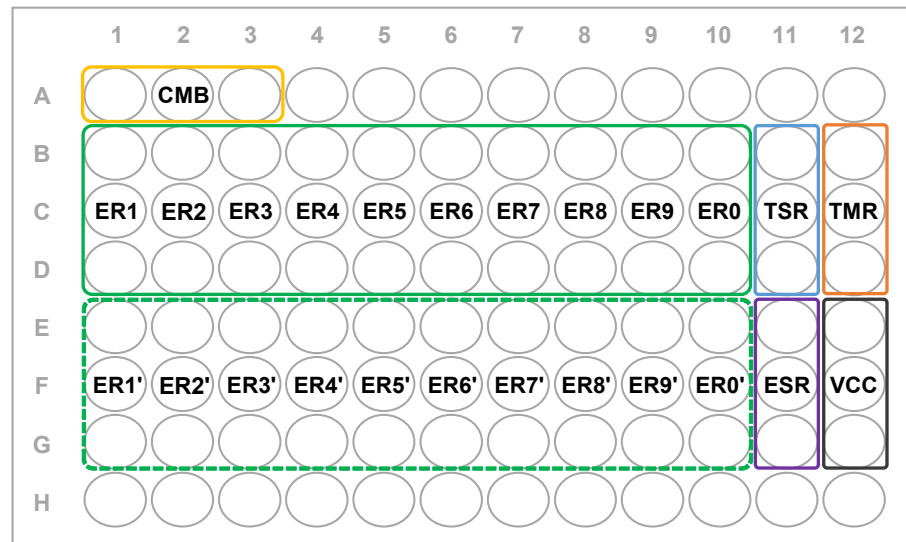
ESR (Effector Spontaneous Release) : エフェクター細胞が自発的に放出する LDH

TSR (Target Spontaneous Release) : ターゲット細胞が自発的に放出する LDH

TMR (Target Maximum Release) : ターゲット細胞に Lysis Buffer を加え、全ての細胞から放出される LDH

CMB (Culture Medium Background) : 培地中に含まれる LDH

VCC (Volume Correction Control) : 培地中に Lysis Buffer を添加時の LDH、体積補正に用いる



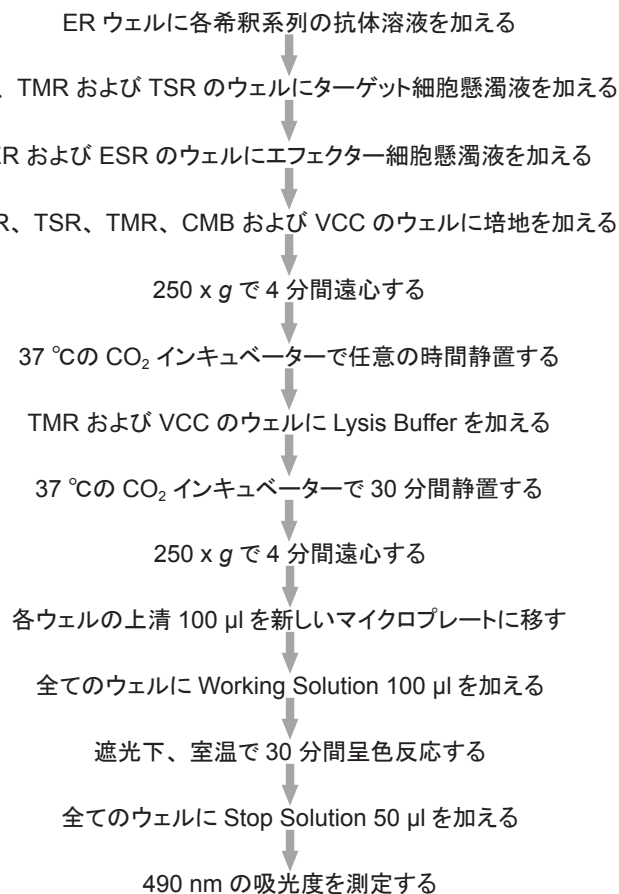
ER' のウェルは異なる種類の被検物質として使用することができます。
A 及び H 行には CMB 以外で使用するウェルにも培地を入れておくことをお勧めします。

図 4 プレート配置例

表 2 各ウェルの液量 (ノンホモジニアス測定)

	ER	ESR	TSR	TMR	CMB	VCC
被検物質 (抗体溶液)	50 μ l	-	-	-	-	-
培地	-	100 μ l	150 μ l	150 μ l	200 μ l	200 μ l
エフェクター細胞懸濁液	100 μ l	100 μ l	-	-	-	-
ターゲット細胞懸濁液	50 μ l	-	50 μ l	50 μ l	-	-
Lysis Buffer	-	-	-	20 μ l	-	20 μ l

測定手順



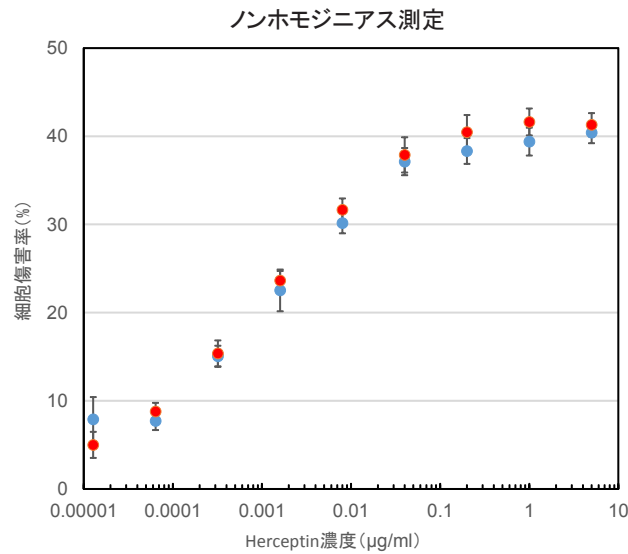
細胞傷害性の算出

- 1) ER、ESR、TSR ウェルの吸光度から CMB の吸光度の値を引く。
- 2) TMR の吸光度から VCC の吸光度の値を引く。
- 3) 以下の式を用いて各被検物質濃度における細胞毒性 (%) を算出する。

$$\text{細胞毒性 (\%)} = \frac{ER - ESR - TSR}{TMR - TSR} \times 100$$

ER: OD 値^{ER} - OD 値^{CMB}
ESR: OD 値^{ESR} - OD 値^{CMB}
TSR: OD 値^{TSR} - OD 値^{CMB}
TMR: OD 値^{TMR} - OD 値^{VCC}

測定例 本キットを用いた Herceptin モノクローナル抗体による抗体依存性細胞傷害測定の実施例



*同一条件で2回測定(赤色、青色)

被検物質: Herceptin
ターゲット細胞 (T 細胞): SK-BR-3 (1x10⁴ cells/well)
エフェクター細胞 (E 細胞): PBMC (1x10⁵ cells/well)
使用培地: RPMI1640 (2% FBS, 1% Antibiotic-antimimetic)
E 細胞および T 細胞比率: 10:1