

死細胞数を測りたい(吸光測定)

使用製品

Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST [CK12]

解析装置



I はじめに

死細胞を測定する方法として、トリパンプルー、Propidium iodide(PI) などによる染色、放射性同位元素 (^{51}Cr など) の放出を測定する方法、細胞から培地中に放出された乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性を測定する方法が用いられている。中でも LDH 活性を測定する方法は、放射性同位体を使用しない、操作が簡単かつ短時間で測定が可能、などの理由から広く用いられている。

細胞から培地中に放出された 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 を生成させ次に生じた NADH は、電子メディエーターを介してテトラゾリウム塩をホルマザンに還元する。生成したホルマザンの量は、放出された LDH 活性に比例するため、ホルマザンの吸光度を測定することで LDH 活性を測定することができる。

Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST 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細胞傷害を測定することが可能である (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ある (ノンホモジニアスアッセイ)。以下に Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST を用いた細胞毒性試験の例を紹介する。

II キット内容

- Dye Mixture
- Assay Buffer
- Lysis Buffer
- Stop Solution

III Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST を用いた測定方法

1. 最適細胞数決定法

※ 細胞種ごとに LDH 量は異なる為、以下の実験を行い、高コントロールと低コントロールの吸光度差が最大となる細胞数を設定することを推奨する。下記の方法を参照いただきたい。

(1) 試薬

• Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST

Working Solution の調製

Dye Mixture に 100 tests の場合 1 ml、500 tests の場合 5 ml の Assay Buffer を加えて溶解する。転倒混和し完全に溶解させた後、Assay Buffer のボトルに全量移す。

(2) 装置

炭酸ガスインキュベーター、クリーンベンチ、プレートリーダー、マルチチャンネルピペット、血球計算盤

(3) 方法 (図 2 参照)

- 1) 対数増殖期の細胞を培地で洗浄し、血球計算盤で計数して培地を用いて 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。High control、Low control 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 3)。
※ 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) 37 °C の炭酸ガス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 分間炭酸ガスインキュベーター内でインキュベーションする。

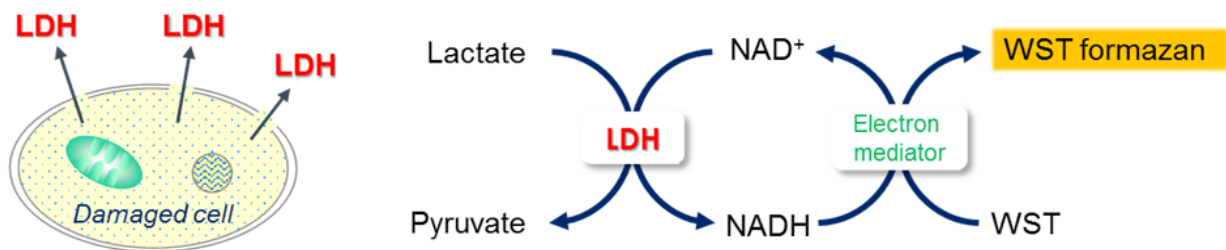


図 1 Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST を用いた細胞毒性の測定原理

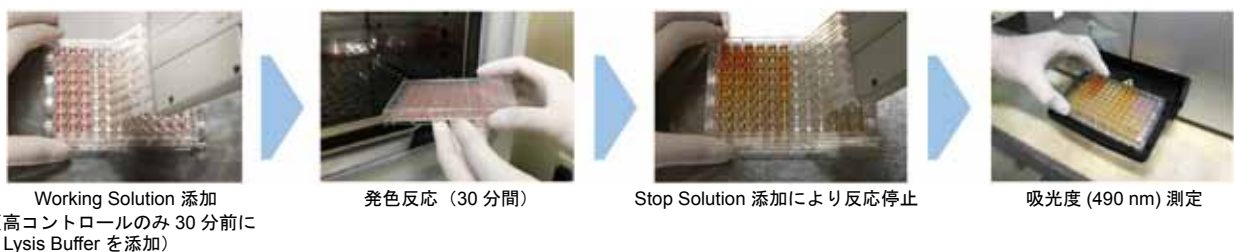


図 2 Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST を用いた測定方法

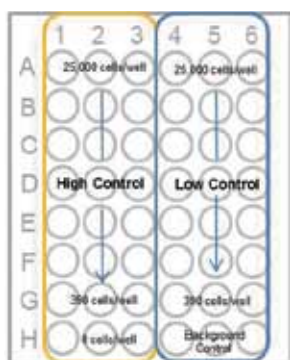


図3 細胞数の最適化の配置例

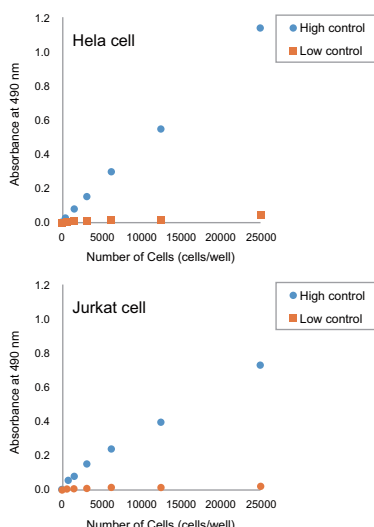


図4 細胞数の最適化

Medium : MEM, 10%FBS (HeLa)
RPMI1640, 10%FBS (Jurkat)
Incubation : 37°C, 5%CO₂, 24 h (HeLa)
37°C, 5%CO₂, 2 h (Jurkat)

- 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。
- 10) 得られた吸光度を縦軸に、細胞数を横軸にプロットし、最適な細胞数を決定する。
 - ・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。

2. 細胞毒性試験法

(1) 試薬

前項を参照

(2) 装置

前項を参照

※ ホモジニアスアッセイの場合、浮遊細胞も平底を使用する。
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 底を使用する。

(3) 方法

(ホモジニアスアッセイ)

- 1) 対数増殖期にある細胞を培地で洗浄し、血球計算盤で計数し、
1. 最適細胞数決定法の操作で決定した細胞数を基に細胞懸濁液を調製する。
- 2) 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 3) へ進む。

- 3) 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 (N=3 で測定する)。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 (表 1 参照)。

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。

- 4) 37 °C で適切な時間炭酸ガス インキュベーター内でインキュベーションする。
- 5) 高コントロールウェルに Lysis Buffer 10 μl を加え、37°C、30 分間炭酸ガスインキュベーター内でインキュベーションする。
- 6) 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。
- 7) 全てのウェルに Stop Solution 50 μl を加える。
- 8) プレートリーダーを用いて 490 nm の吸光度を測定する。

(ノンホモジニアスアッセイ)

- 1) 対数増殖期にある細胞を培地で洗浄し、血球計算盤で計数し、上記 1) の操作で決定した細胞数を基に細胞懸濁液を調製する。
- 2) 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、新しい培地 100 μl に交換した後に操作 3) へ進む。
- 3) 培地で目的の濃度に調製した被験物質溶液 100 μl を 2) の細胞懸濁液に加える (N=3 で測定する)。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 (表 2 参照)。

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	-	-

- 4) 37°C の炭酸ガス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。
- 5) 高コントロールウェルに Lysis Buffer 20 μl を加え、37°C、30 分間炭酸ガスインキュベーター内でインキュベーションする。
- 6) 250 × g、2 分間、マイクロプレートを遠心する。
- 7) 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。
- 8) 全てのウェルに Working Solution 100 μl を加える。
- 9) 遮光下、室温で 30 分間呈色反応を行う。
- 10) 全てのウェルに Stop Solution 50 μl を加える。
- 11) 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)

被験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。

$$\text{細胞毒性 (\%)} = [(A-C) / (B-C)] \times 100$$

A: 被験物質の吸光度

B: 高コントロールの吸光度

C: 低コントロールの吸光度

細胞増殖/毒性
酸化ストレス
分子生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶性剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極
その他
機能性
有機材料

3. Mitomycin C を用いた細胞毒性試験 (ホモジニアスアッセイ)

- (1) 試薬
前項を参照
- (2) 装置
前項を参照
- (3) 方法
 - 1) 対数増殖期にある HeLa 細胞を培地で洗浄し、血球計算盤で計数し、 1.0×10^5 cells/ml の細胞懸濁液を調製する。
 - 2) 平底 96 穴マイクロプレートに培地で調製した HeLa 細胞懸濁液 50 μ l を加える。
 - 3) 一晚インキュベーションした後、新しい培地 50 μ l に交換する。
 - 4) 培地で目的の濃度に調製した Mitomycin C (終濃度 $1 \sim 24 \times 10^{-6}$ mmol/l) を含む培地 50 μ l を添加する。
 - 5) 37°C で 48 時間炭酸ガス インキュベーター内でインキュベーションする。
 - 6) 高コントロールウェルに Lysis Buffer 10 μ l を加え、37°C、30 分間炭酸ガスインキュベーター内でインキュベーションする。
 - 7) 各ウェルに Working Solution 100 μ l を加える。遮光下、室温で 30 分間呈色反応を行う。
 - 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) 前ページの細胞毒性の算出式を用いて細胞毒性を算出する。

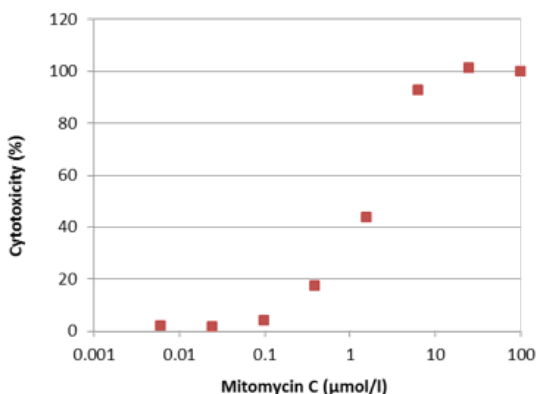


図5 細胞毒性試験 (Mitomycin C)

4. TritonX-100 を用いた細胞毒性試験 (ノンホモジニアスアッセイ)

- (1) 試薬
前項を参照
- (2) 装置
前項を参照
- (3) 方法
 - 1) 対数増殖期にある HL60 細胞を培地で洗浄し、血球計算盤で計数し、 10×10^5 cells/ml の細胞懸濁液を調製する。
 - 2) 96 穴マイクロプレートに調製した細胞懸濁液 100 μ l を加える。
 - 3) 培地で目的の濃度に調製した TritonX-100 (終濃度 $2 \sim 78 \times 10^{-6}$ mmol/l) を含む培地 50 μ l を添加する。
 - 4) 37°C の炭酸ガス インキュベーターで 1.5 時間インキュベーションする。
 - 5) 高コントロールウェルに Lysis Buffer 20 μ l を加え、37°C、30 分間炭酸ガス インキュベーター内でインキュベーションする。
 - 6) 250 \times g、2 分間、マイクロプレートを遠心する。
 - 7) 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。

- 8) 全てのウェルに Working Solution 100 μ l を加える。遮光下、室温で 30 分間呈色反応を行う。
- 9) 全てのウェルに Stop Solution 50 μ l を加える。
- 10) プレートリーダーを用いて 490 nm の吸光度を測定する。
- 11) 前ページの細胞毒性の算出の式を用いて細胞毒性を算出する。

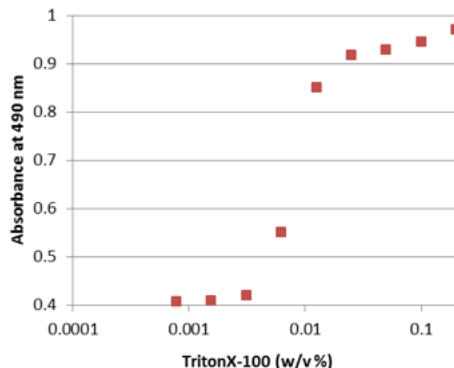


図6 細胞毒性試験 (TritonX-100)

5. 補体依存性細胞障害性試験 (CDC assay)

- (1) 試薬
 - ・ Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST
 - ・ 培地 (RPMI1640)
 - ・ ヒト血清補体
 - ・ 抗ヒト CD20 マウスモノクローナル抗体 (B-H20)
- (2) 装置
前項を参照
- (3) 方法
 - 1) 対数増殖期にある Raji 細胞を 5% 補体含有培地 (RPMI1640、5% complement 添加) で洗浄し、血球計算盤で計数し、 40×10^4 cells/ml の細胞懸濁液を調製する。
 - 2) 96 穴マイクロプレートに調製した細胞懸濁液 50 μ l を加える。
 - 3) 5% 補体含有培地で目的の濃度に調製した抗 CD20 抗体溶液 (終濃度 $100 \sim 1.0 \times 10^{-5}$ μ g/ml) 50 μ l を加える (N=3 で測定)
 - 4) 37°C の炭酸ガスインキュベーターで 2 時間インキュベーションする。
 - 5) 全てのウェルに Working Solution 100 μ l を加える。
 - 6) 遮光下、室温で 15 分間呈色反応を行う。
 - 7) 全てのウェルに Stop Solution 50 μ l を加える。
 - 8) プレートリーダーを用いて 490 nm の吸光度を測定する。

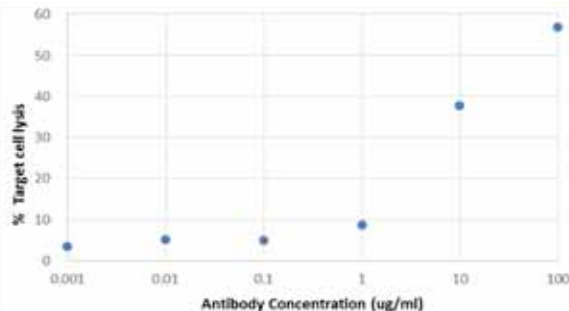


図7 補体依存性細胞障害試験

最新の測定データやアプリケーション、論文情報を小社 HP にて掲載。ご興味のある方は、小社 HP にて最新情報をご確認下さい。

LDH 同仁 検索