

EZ-LDH

Cell Cytotoxicity Assay Kit

Cat. No. DG-LDH500

DG-LDH1000

FOR RESEARCH USE ONLY.

NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

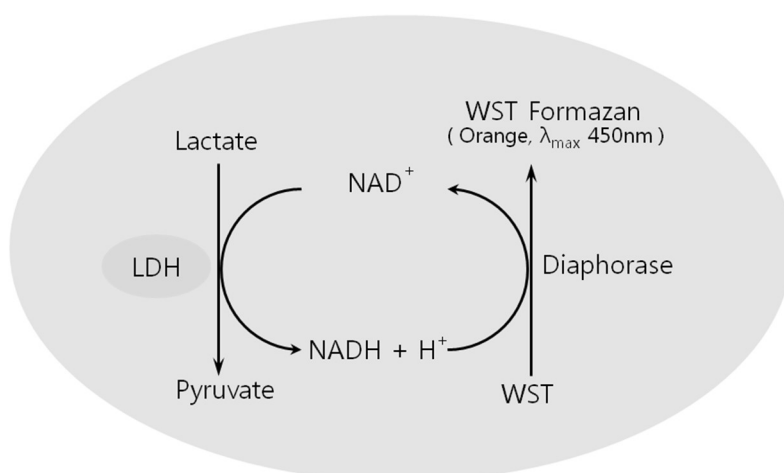
▪ Product Description

Apoptosis 혹은 necrosis 등에 의하여 죽거나 손상된 세포에서 방출되는 Lactate dehydrogenase(LDH)의 양을 고감도로 측정함으로써 cytotoxicity/cytolysis를 간단하게 측정할 수 있는 kit입니다.

Cytotoxicity (Cell death)는 cell viability test를 통하여 간접적으로 측정할 수 있지만, 더 sensitive하고, 정확한 측정을 위해서는 cell death 또는 cell damage와 관련된 효소를 이용한 방법으로 실험하는 것이 좋습니다.

Lactate dehydrogenase(LDH)는 세포질에 존재하는 stable enzyme으로 통상적으로는 세포막을 통과하지 못하여 세포 밖으로 배출되지 않으나, 세포막이 손상되거나 세포가 죽는 경우 배지 중으로 방출됩니다. 그렇기 때문에 배지중의 LDH 양은 죽거나 혹은 상해를 입은 세포의 수와 비례하게 됩니다.

EZ-LDH cytotoxicity assay kit는 이러한 LDH의 특성에 기반하여, 세포에서 방출된 LDH의 양을 water soluble tetrazolium salt (WST)를 이용하여 흡광도(450 nm)를 측정하는 방식을 통해 cell cytotoxicity test를 간편하고 빠르게 수행할 수 있는 제품입니다.



Cell cytotoxicity detection mechanism with EZ-LDH

▪ Kit Contents and Storage Conditions

Component	DG-LDH500	DG-LDH1000	Part Number
	500 assay	1000 assay	
WST Substrate Mix	1 vial (-20°C)	2 vials (-20°C)	DG-LDH S1
LDH Assay Buffer	50 ml (0~4°C)	100ml (0~4°C)	DG-LDH B50
Cell Lysis Solution	6 ml (0~4°C)	6ml (0~4°C)	-
Stop Solution	6 ml (0~4°C)	6ml (0~4°C)	-

* 동결 건조된 WST Substrate는 -20°C에서 6개월간 안정합니다.

▪ Media

10% FBS가 함유된 media를 사용하여 실험을 진행합니다.

Background를 낮추고 싶은 경우 무혈청 배지를 사용하시거나, 혹은 FBS의 함량을 낮추어 사용하면 됩니다.

▪ Preparation of Working Solution

Solution	Preparation	Storage and Stability
WST Substrate Mix	1 vial에 증류수 1.1 mL을 첨가한 후, 10분간 혼합하여 완전히 용해한다. ** do not vortex	용해한 용액은 -20°C에서 2개월 동안 안정합니다.
Reaction Mixture (Protect from light)	For 100 tests : 200 μ L WST Substrate Mix와 10 mL LDH Assay Buffer를 혼합한다.	반응 혼합액은 사용 직전에 혼합하여 사용 하는 것이 좋습니다.

▪ Preparation of Control

실험방법은 적정 세포수를 정하기 위한 예비실험 외에 크게 Normal Cytotoxicity assay 와 Cell mediated Cytotoxicity assay 두 가지 방법으로 나눌 수 있으며, 실험에 공통적으로 필요한 control 군은 다음과 같습니다.

1) Background control

Media의 FBS에 포함되어 있는 LDH를 측정합니다.

2) Low control

실험과정 중 자연적으로 죽거나 손상된 세포에서 방출되는 LDH의 양을 측정합니다.

3) High control

실험에 사용된 세포에 Lysis solution 10 μ L를 첨가시켜 세포를 인위적으로 살해하여, 세포에서 방출 가능한 최대의 LDH의 양을 측정합니다.

4) Volume control

Assay media 100 μ L에 Lysis solution 10 μ L을 첨가하여 측정하며,

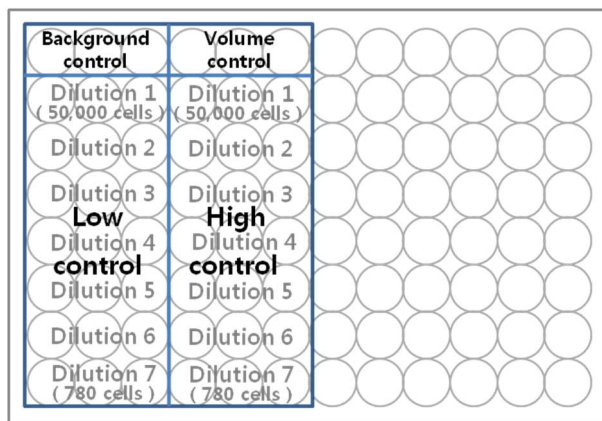
High control에서 lysis solution 사용에 의해 늘어난 volume을 보정하기 위하여 필요합니다.

▪ Optimization of Cell number

LDH의 함량은 세포의 종류에 따라 차이가 있으므로 보다 정확한 실험결과를 얻기 위해서는 예비실험을 통하여 최적의 세포농도를 결정하는 것이 좋습니다.

(Cell mediated cytotoxicity assay의 경우 Target cell만 예비실험을 진행합니다.)

1. 배양중인 세포를 모아 5×10^4 cells/well 의 농도가 되도록 세포 현탁액을 준비합니다.
2. Low control과 High control을 각각 3개씩 설정하여 준비한 세포현탁액을 2배씩 serial dilution을 합니다. 이때 Background control과 Volume control도 준비합니다.



Background control :

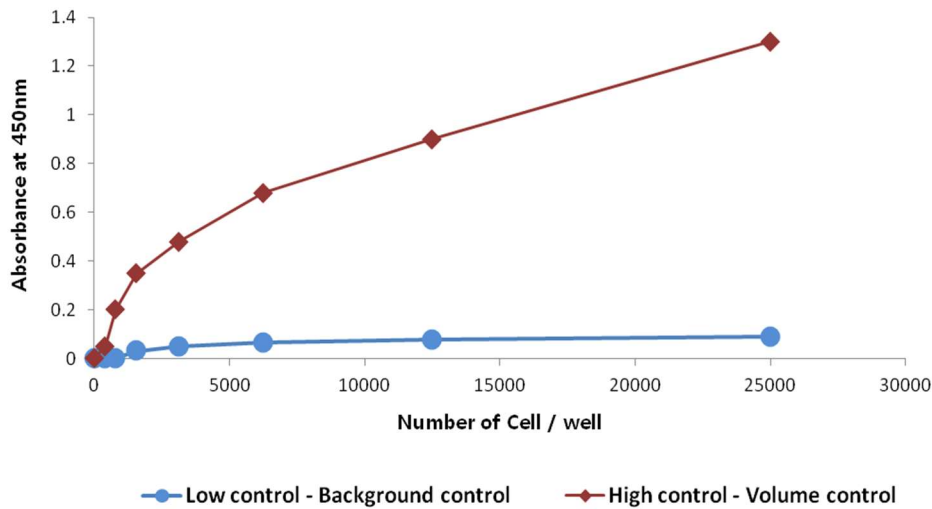
100 μ l assay media를 3개의 well에 준비합니다.

Volume Control :

100 μ l assay media를 3개의 well에 준비합니다.

3. 실험 조건에 맞게 적절한 시간 동안 incubator에서 반응 시킵니다.
(e.g. 6, 12, 24, 48 hours등 본 실험의 경우와 동일시간 배양합니다.)
4. 배양이 끝난 plate상의 High control군과 Volume control군에 Lysis solution을 well 당 10 μ l씩 넣어줍니다. (Lysis가 잘 되도록 pipetting 해주거나 상온에서 5분 동안 반응시킵니다.)
5. 원심분리기를 이용하여, 배지 중에 떠있는 세포를 침전시켜줍니다. (600xg, 5 minutes)
6. 상층액 10 μ l를 취하여 새로운 96 well plate에 옮깁니다.
(세포의 침전이 흐트러지지 않도록 주의 합니다.)
7. LDH Reaction Mixture를 제조하여 각 well에 100 μ l씩 첨가한 후, 조심스럽게 섞어줍니다.
8. Plate를 빛이 차단된 상온에서 30분간* 반응시킵니다.
* multiple time point 측정이 가능하여 반응 시간 조절이 가능합니다.
흡광도 Low control $OD_{450} < 0.8$, High control $OD_{450} < 2.0$ 범위 안에서 적절한 흡광도 값을 가지는 시간으로 조절하시기 바랍니다.
9. 흡광도를 측정하기 전 부드럽게 shaking 한 후, Plate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정합니다. (Reference wavelength : 600~650 nm)
10. Low control과 High control의 흡광도 차이가 최대가 되는 세포농도로 적정세포 수를 결정합니다.

* 세포의 최적농도 결정의 예

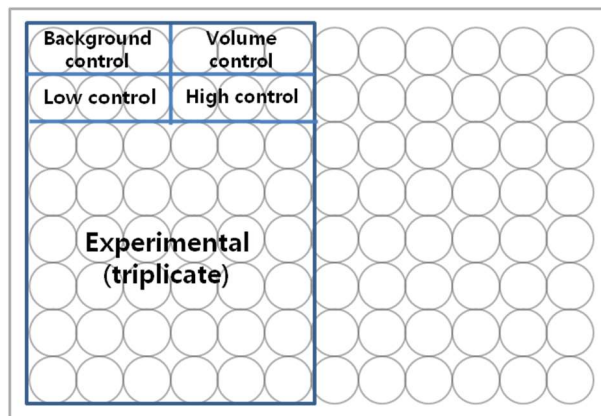


Optimization of Cell number 의 방법에 따라 실험 후, High control과 Low control을 Volume control과 Background control로 각각 보정하여 다음과 같은 결과를 얻었을 경우 실험에 적합한 최적의 세포수는 흡광도의 차이가 가장 많이 나는 25,000 cells/well(100 μ l)입니다.

▪ General Protocol – Cell Cytotoxicity Assay

A. Normal Cytotoxicity Protocol

1. **Optimization of Cell number** 예비실험을 통해 결정된 세포수의 2배 농도로 세포 현탁액을 준비하여 96 well plate에 well당 50 μ l씩 분주하여, 24시간 정도 CO₂ incubator에서 배양합니다. (e.g., at 37°C, 5% CO₂)



2. 다양한 농도로 준비된 실험물질을 각 well에 50 μ l씩 첨가합니다.
(이때 각각의 control군에는 배지 50 μ l씩 넣어 총 volume을 100 μ l로 맞추어 줍니다.)
3. 실험 조건에 맞게 적절한 시간 동안 incubator에서 반응시킵니다. (e.g. 6, 12, 24, 48 hours)
4. High control군과 Volume control군에 Lysis solution을 well 당 10 μ l씩 넣어줍니다.
(Lysis가 잘 되도록 pipetting 해주거나 상온에서 5분 동안 반응시킵니다.)

- 원심분리기를 이용하여, 배지 중에 떠있는 세포를 침전시킵니다. (600 xg, 5 minutes)
- 상층액 10 μl 를 취하여 새로운 96 well plate에 옮깁니다.
(세포의 침전이 흐트러지지 않도록 주의합니다.)
- LDH Reaction Mixture을 제조하여 각 well에 100 μl 씩 첨가한 후, 조심스럽게 섞어줍니다.
- Plate를 빛이 차단된 상온에서 30분간* 반응시킵니다.
* multiple time point 측정이 가능하여 반응 시간 조절이 가능합니다.
흡광도 Low control $\text{OD}_{450} < 0.8$, High control $\text{OD}_{450} < 2.0$ 범위 안에서 적절한 흡광도 값을 가지는 시간으로 조절하시기 바랍니다.
- 흡광도를 측정하기 전 부드럽게 shaking 한 후, Plate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정합니다. (Reference wavelength 600~650 nm)
* option : 10 μl Stop solution을 넣어 반응을 정지 시킬 수 있습니다.

* Calculation of cytotoxicity

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{A - B}{C - B} \times 100$$

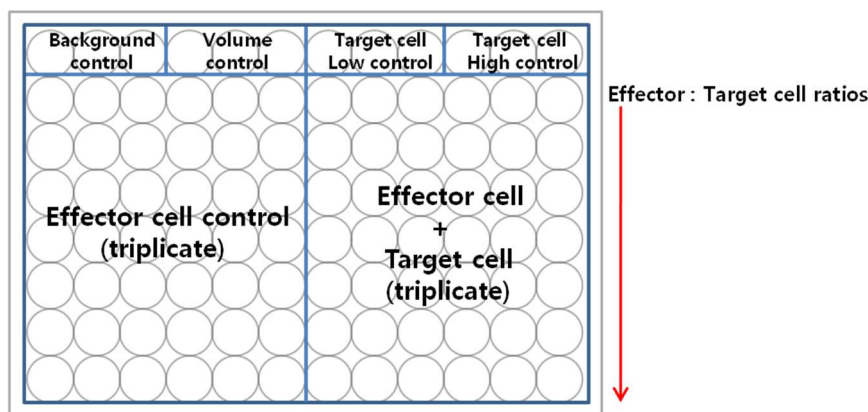
A : Exp. - Background control

B : Low control - Background control

C : High control - Volume control

B. Cell mediated Cytotoxicity Protocol

- Effector cell(NK cell, CTLs 등)를 측정배지를 이용하여 2배씩 희석하여 96well plate에 50 μl 씩 분주합니다. 이때 Effector cell 에서 자연적으로 방출되는 LDH 측정을 위해 effector cell control군도 설정하여 준비합니다.



- Target cell을 **Optimization of Cell Concentration** 예비실험을 통해 결정된 세포수의 2배 농도로 세포현탁액을 준비하여 effector cell이 있는 well에 50 μl 씩 넣어줍니다. 이때 Target cell의 Low control과 High control을 각각 3개의 well에 만들어 줍니다. (각각의 control 군에는 배지 50 μl 씩 넣어 총 volume을 100 μl 로 맞추어 줍니다.)

3. 실험 조건에 맞게 적절한 시간 동안 incubator에서 반응 시킵니다. (e.g. 2, 4, 6 hours)
4. Target cell High control군과 Volume control군에 Lysis solution을 well당 10 μ l씩 넣어 줍니다. (Lysis가 잘 되도록 pipetting 해주거나 상온에서 5분 동안 반응시킵니다.)
5. Normal Cytotoxicity Protocol의 5~9과 동일하게 측정합니다.

* Calculation of cytotoxicity

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{A - B - C}{D - B} \times 100$$

A : Exp. – Background control

B : Target cell low control – Background control

C : Effector cell control – Background control

D : Target cell high control – volume control

▪ Related Product

	Products	Catalog No.	Assay
Cell Proliferation / Cytotoxicity	EZ-Cyttox	EZ-500	500 Assay
		EZ-1000	1000 Assay
		EZ-3000	3000 Assay
		EZ-5000	5000 Assay
		EZ-BULK150	10000 Assay
	EZ-Cyttox ^{PLUS}	EZ-3000P	3000 Assay
Cell Cytotoxicity	EZ-LDH	DG-LDH500	500 Assay
		DG-LDH1000	1000 Assay