

# EZ-CYTOX

Cell Viability, Proliferation & Cytotoxicity Assay Kit

Cat. No. EZ-500

EZ-1000

EZ-3000

EZ-5000

EZ-BULK150

FOR RESEARCH USE ONLY.

NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

## ▪ Product Description

EZ-CYTOX는 WST를 이용하여 살아있는 세포의 양을 측정하는 제품으로써 Cell Viability, Proliferation & Cytotoxicity Assay 등에 사용할 수 있습니다. WST는 물에 잘 녹는 High Sensitive Water Soluble Tetrazolium Salt로써 살아있는 세포의 Dehydrogenase와 반응하여 오렌지 색의 수용성 formazan을 생성합니다. WST와 반응하는 Dehydrogenase는 대사적으로 왕성한 활동을 하는 세포의 미토콘드리아 전자전달계에 존재하는 효소로써 살아있는 세포에만 유효합니다. 따라서 formazan의 생성은 살아있는 세포수와 직선 상관관계를 가지며, 이는 흡광도(450 nm)를 측정함으로써 알 수 있습니다.

EZ-CYTOX는 멸균 처리된 One Bottle Solution으로 사용 전 준비단계 없이 사용 가능하며, formazan을 녹이는 과정이 불필요하고 배양액을 제거할 필요가 없어 Suspension cell에 대해서도 간편하게 실험을 수행할 수 있습니다.

## ▪ Kit Contents

Catalog No.	Assay	Qty.
EZ-500	500 tests	5 mL x 1 bottle
EZ-1000	1000 tests	5 mL x 2 bottles
EZ-3000	3000 tests	5 mL x 6 bottles
EZ-5000	5000 tests	25 mL x 2 bottles
EZ-BULK150	10000 tests	25 mL x 4 bottles

## ▪ Storage and Stability

- 0~4 °C 냉장보관 하며, 제조일로부터 1년간 활성의 변화 없이 사용 가능합니다.
- -20 °C 보관 시 2년 이상 사용이 가능하나 냉동-해동 반복 시 제품의 활성이 떨어지고 background가 증가할 수 있습니다.

## ▪ Blank

실험에 사용된 배양배지 100  $\mu$ L (without cell) 와 EZ-Cytox 10  $\mu$ L를 섞어 blank로 사용합니다.

배지의 종류, incubation 시간, 빛의 노출 때문에 미약한 흡광도가 측정될 수 있기 때문에 blank를 설정해 주시기 바랍니다. (보통 1hr 반응 시 0.3 내외로 측정됩니다.)

## ▪ Optimization of Cell Concentration (선택사항)

실험에 사용할 세포의 수와 EZ-Cytox 첨가후 반응시간은 세포의 종류 및 배양조건에 따라 차이가 있기 때문에 예비실험을 통하여 결정하는 것이 좋습니다. 이는 MTT, MTS등 다른 solution을 사용하여 실험할 때에도 필요한 과정입니다.

1. 배양중인 세포를 모아 적절한 농도가 되도록 세포 현탁액을 준비 합니다.

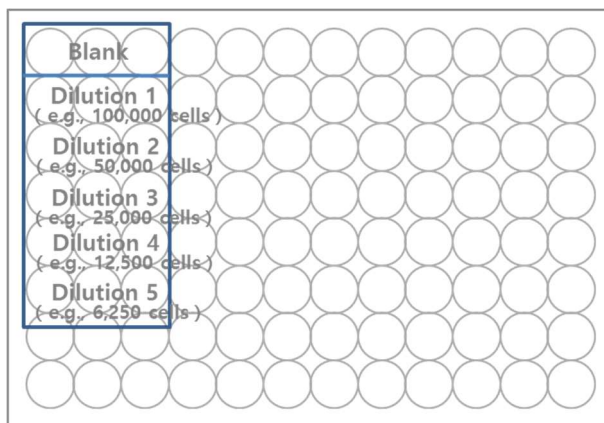
\* 참고 논문, 기존실험 등을 참고하여 적절한 세포 농도를 결정 합니다.

예) Viability, Proliferation assays =  $0.1 - 5 \times 10^4$  cells/well

Cytotoxicity assays =  $2 \times 10^4 - 5 \times 10^5$  cells/well

2. 준비한 세포 현탁액을 serial dilution을 합니다. (3~5 set)

3. 위에서 준비한 세포 현탁액을 96well plate에 well당  $100\mu\text{l}$ 씩 분주하여, CO<sub>2</sub> incubator에서 Pre-incubate 합니다. ( e.g., at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> for 2~24hrs )



\* 그림의 세포수는 예시입니다.  
세포 종류, 논문 등을 참고하여 결정하시기 바랍니다.

4. 실험 조건에 맞게 적절한 시간 동안 incubator에서 배양시킵니다.

\* 배양시간은 본 실험 시 실험물질을 첨가하여 반응시키는 시간을 기초로 합니다.

실험조건을 잡는 예비실험이기 때문에 실험물질은 처리하지 않습니다.

(e.g., 6, 12, 24, 48 hours)

5. EZ-Cytox  $10\mu\text{l}$ 를 각 well에 첨가하여 incubator에서 반응시킵니다.

6. Plate reader를 이용하여 30분부터 최대 4시간까지 흡광도를 체크하여 적정 세포수와 EZ-Cytox와의 반응시간을 결정해 줍니다. (O.D. 450 nm)

\* 흡광도 측정 전 1분 정도 부드럽게 shaking해줍니다.

보통 30min 마다 흡광도를 측정해 주고, 흡광도 측정 후 incubator에 다시 넣어 반응 시켜줍니다.

\* 권장 반응시간은 1 hr 입니다.

## ▪ Protocol – Cell Proliferation & Cytotoxicity Assay

1. 세포 배양액을 준비하여 96well plate에 well당 100 $\mu$ l씩 분주하여,  
CO<sub>2</sub> incubator에서 Pre-incubate 합니다. ( e.g., at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> for 2~24hrs )
2. 다양한 농도로 준비된 실험물질 (e.g. toxicant)을 각 well에 10  $\mu$ l씩 첨가합니다.
3. 실험 조건에 맞게 적절한 시간 동안 incubator에서 반응시킵니다.  
( e.g. 6, 12, 24, 48 hrs )
4. EZ-Cytox 10  $\mu$ l를 각 well에 첨가해 줍니다.  
  
\* 노란색 또는 진한색의 실험물질 (식물 추출물 등), Reducing agent 사용시  
washing이 필요하며, Note 4번을 참고하여 진행해 주시기 바랍니다.
5. 0.5~4 시간 정도 incubator에서 반응시킵니다.
6. 흡광도를 측정하기 전 1분 정도 부드럽게 shaking 합니다.
7. Plate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정합니다.  
( Reference wavelength 600~650nm )

## ▪ Note

1. EZ-CYTOX 첨가 후의 반응 시간은 세포의 종류나 농도에 따라 다르므로, 본실험을  
수행하기 전 최적의 실험 결과를 위하여, 예비실험을 통해 실험에 사용할 세포수와  
최적 반응 시간을 결정하는 것이 좋습니다.
2. 흡광도 측정시 bubble이 있는 경우 정확한 흡광도 측정이 어려울 수 있습니다.  
흡광도 측정 전 bubble을 제거해 주는 것이 좋습니다.
3. 실험에 사용하려는 실험물질이 reducing agents인 경우 EZ-CYTOX내의 WST와  
반응하여 formazan을 형성할 수 있습니다. Reducing agent를 사용하실 경우,  
실험전 흡광도 측정을 통해 확인해 보는 것이 좋습니다.
4. EZ-Cytox 첨가전 washing 이 필요한 경우 PBS를 이용하여 2~3 회 정도 washing해 줍니다.  
Pump를 이용한 Suction system 사용시 세포가 떨어져 나와 결과에 영향을 줄 수  
있기 때문에 가급적 Multi-channel pipette을 이용하여 Well의 벽면에서 wash out  
해주시기 바랍니다. Washing 후 각 well에 배양배지를 100  $\mu$ l씩 넣어주고  
protocol 4번부터 실험을 진행하시면 됩니다.  
  
\* 선택사항 : 배양 배지에 미리 EZ-Cytox 10 %를 혼합하여 넣어도 됩니다.  
예 : media 10 ml + EZ-Cytox 1 ml 을 섞어서 100  $\mu$ l 씩 well에 분주 후 protocol 5번부터 진행

## ▪ Calculation of viability

$$\text{Viability (\%)} = \frac{\text{Exp. - Blank}}{\text{Control - Blank}} \times 100$$

**Blank** : absorbance of a well medium and EZ-Cytox, without cell

**Control** : absorbance of a well with cell and EZ-Cytox, without test solution

**EXP.** : absorbance of a well with cell, test solution and EZ-Cytox

## ▪ Q & A

**Q1: MTT, MTS, XTT를 사용하는 타사 제품들과 WST를 사용하는 EZ-CYTOX의 차이점은 무엇인가요?**

기본적인 측정원리는 같지만, 각각의 tetrazolium salt에 의해 생성된 formazan의 물에 대한 용해성이 다릅니다. MTT의 경우는 물에 녹지 않은 크리스탈 형태의 formazan을 형성하기 때문에 DMSO 같은 유기용매나 계면활성제를 이용하여 용해해야 하는 번거로운 과정이 필요하며, MTS와 XTT는 MTT의 변형체로서 수용성의 formazan을 형성하지만, WST에 비해 용해성과 안정성이 낮습니다. 때문에 WST를 사용하는 EZ-CYTOX가 타사제품에 비해 감도가 높고, 측정범위가 넓은 장점을 가집니다. 또한, WST의 감도를 자사의 기술로 업그레이드시켜 WST를 사용하는 타사 제품과 동등하거나 더 좋은 감도로 측정이 가능합니다.

**Q2: EZ-CYTOX를 첨가한 후 흡광도 측정 시 이용할 수 있는 파장의 영역은 어떻게 되나요?**

450 nm를 사용하시는 것이 좋습니다.

450 nm filter가 없는 경우 420-480 nm 사이의 파장에서 측정이 가능합니다.

**Q3: 96 well 이외에 다른 크기의 well에도 사용이 가능한가요?**

96 well 뿐 아니라 6, 24, 48, 384 well 등 모든 micro well plate와 다양한 size의 dish에도 사용 가능합니다. 이런 경우 EZ-CYTOX를 total volume의 1/10로 첨가해 주면 됩니다.

(예 : cell in media 200  $\mu\text{l}$  + 반응물질 100  $\mu\text{l}$  인 경우 total volume이 300  $\mu\text{l}$  이므로, 1/10인 30  $\mu\text{l}$ 의 EZ-CYTOX를 well에 첨가해주면 됨.)

**Q4: 현미경 관찰 시 세포들이 많이 죽은 것으로 보이는데, EZ-CYTOX로 실험한 결과로는 viability가 높은 것으로 나옵니다. 왜 그런가요?**

a. 이런 경우 대부분 죽은 것으로 관찰된 세포들이 실질적으로는 damaged cell들로 아직 NADH-dehydrogenase의 활성이 남아있어서 EZ-CYTOX와 반응하기 때문입니다. 실험 목적상 이러한 damaged cell들을 죽은 것으로 counting 해야 한다면 wash out 등으로 제거한 후 다시 측정해야 합니다.

- b. 실험물질에 의하여 EZ-Cytox가 환원이 되는 경우 발생되기도 합니다.  
이런 경우 note 4번을 참고하여 washing 후 실험을 진행해 주시기 바랍니다.

**Q5: EZ-CYTOX로 실험한 세포를 이용하여 다른 test를 하고 싶습니다. 가능한가요?**

EZ-CYTOX는 cell toxicity가 거의 없고, 세포에 영향을 주지 않기 때문에 EZ-CYTOX를 이용한 assay가 끝난 후, DNA나 RNA extraction 및 western blot 등 다른 실험들이 가능합니다.

**Q6: Reference wavelength에서 왜 흡광도를 측정하나요?**

실험결과에 영향을 주는 다른 요소들을 측정합니다. (well plate의 굴곡, 배지의 탁도 등)  
보통의 경우 Reference wavelength에서의 흡광도는 0.05 내외로 측정이 됩니다.

▪ **Reference**

1. Zhegang Huang, et al., Nature Communications. 2011, 2,459,
2. Cheol Am Hong, et al., J. Am. Chem. Soc., 2011, 133 (35), pp 13914–13917
3. Gwang Sig Yu, et al., Bioconjugate Chem., 2011, 22 (6), pp 1046–1055
4. Jae-Hyuk Jang, et al., J. Am. Chem. Soc., 2011, 133 (18), pp 6865–6867
5. Sang Un Lee, et al., J. Nat. Prod., 2011, 74 (5), pp 1284–1287

▪ **Related Product**

Product	Catalog No.	Assay
<b>EZ-Cytox<sup>Plus*</sup></b>	EZ-3000P	3000 tests
<b>LDH Assay Kit<sup>**</sup></b>	DG-LDH500	500 tests
	DG-LDH1000	1000 tests

\* EZ-Cytox 보다 감도가 향상된 제품으로 대사활동이 느려 반응시간이 오래 걸리거나, 적은 세포로 고감도 실험을 해야 하는 경우 사용합니다.

\*\* 작은 세포에서 방출하는 LDH 효소를 측정함으로써 Cytotoxicity를 고감도로 측정할 수 있는 kit. 상층액을 이용하기 때문에 EZ-Cytox 실험과 병행할 경우 한번의 실험으로 두가지 데이터를 얻을 수 있습니다.

※ 본 protocol은 사용자 분들의 실험을 돕기 위해 제작되었습니다.  
관련 업체의 무단 복제 및 변형하여 유포를 금하며,  
본사와 상의 없이 무단 이용할 경우 법적인 책임을 질 수 있습니다.

## ▪ Related Product

	Products	Catalog No.	Assay
<b>Cell Proliferation / Cytotoxicity</b>	EZ-Cytox	EZ-500	500 Assay
		EZ-1000	1000 Assay
		EZ-3000	3000 Assay
		EZ-5000	5000 Assay
		EZ-BULK150	10000 Assay
	EZ-Cytox <sup>PLUS</sup>	EZ-3000P	3000 Assay
<b>Cell Cytotoxicity</b>	EZ-LDH	DG-LDH500	500 Assay
		DG-LDH1000	1000 Assay

