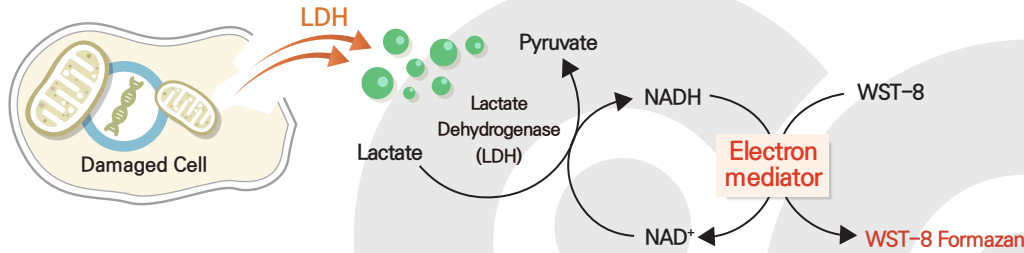


# Quanti-LDH™ PLUS Cytotoxicity Assay Kit

(BCT-LDHP500/1000, 500/1000 tests, Store at 4°C)

## 제품 원리



Quanti-LDH PLUS Cytotoxicity Assay Kit (WST-8)는 세포에서 방출되는 LDH를 WST를 이용하여 흡광 490 nm에서 Cytotoxicity를 측정하는 제품으로서, Chemical 타입의 전자전달체를 사용하여 기존 효소 타입의 전자전달체를 사용하는 Quanti-LDH 제품의 단점을 보완하였습니다. Chemical을 이용하기 때문에 Enzyme 기반의 제품에 비해 상온 안정성을 높였으며 기존 6개월의 유통기한을 1년으로 높여 사용자의 편의를 증대시켰습니다. 또한 실험 과정이 간소화되어 사용이 편리해졌으며 실험에 사용한 세포를 이용하여 Cell viability assay까지 확인할 수 있어 실험에 소요되는 시간을 획기적으로 줄였습니다.

## 제품의 구성 및 보관 조건

Comopnent	BCT-LDHP500	BCT-LDHP1000	Storage
LDH Assay Buffer	50 mL	50 mL x 2 Bottles	4°C
WST Substrate Mix	1 Bottle	2 Bottles	
Cell Lysis Solution	5 mL	5 mL x 2 Bottles	
Stop Solution	5 mL	5 mL x 2 Bottles	

\* 개봉하지 않은 제품은 빛을 차단한 상태에서 4°C 보관 시 약 1년간 안정적입니다.

## 검사 필요 장비 및 소모품

- ▶ 8 or 12 Channel micropipette
- ▶ Pipette & Sterile tips
- ▶ CO<sub>2</sub> Incubator (37°C)
- ▶ 96-well Microplate (Clear, Flat bottom)
- ▶ Colorimetric microplate reader (490nm filter)
- ▶ Medium : 10% FBS가 함유된 Media를 사용하여 실험을 진행합니다.

## 실험 전 준비사항 및 보관 방법

### Reaction mixture

- ① WST Substrate Mix에 LDH Assay Buffer를 넣어 녹여줍니다 (100 Tests: 0.5 mL, 500 Tests: 5 mL).
- ② 녹인 WST Substrate Mix를 LDH Assay Buffer bottle에 다시 혼합하여 사용합니다.  
Bottle 상태로 4°C 에서 6 개월 동안 보관하며 사용 가능합니다.

### Control

실험 시 공통적으로 필요한 Control은 다음과 같습니다.

- **Background control** : Medium의 FBS에 포함되어 있는 LDH를 측정합니다.
- **Low control** : 실험 과정 중 자연적으로 죽거나 손상된 세포에서 방출되는 LDH를 측정합니다.
- **High control** : 실험에 사용된 세포에 Cell Lysis Solution 10 μL 를 첨가하여 세포를 인위적으로 사멸시켜 세포에서 방출 가능한 최대의 LDH를 측정합니다.

\* Background를 낮추고 싶은 경우, 무혈청 배지를 사용하시거나, 혹은 FBS의 함량을 낮추어 사용하시면 됩니다.

## 실험 과정

### Single 측정

#### ▶ 세포 수의 최적화

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

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

- ① 세포 배양에 사용한 media와 같은 조성의 media를 최적화 실험에 사용하는 모든 well에 100  $\mu$ l씩 넣어줍니다.
- ② 배양 중인 세포를 모아 5 X 10<sup>5</sup> cells/ml의 세포 현탁액을 준비합니다.
- ③ Low control과 High control을 각 3개씩 설정하여 100  $\mu$ l 씩 (5 X 10<sup>4</sup> cells/well) 분주합니다.
- ④ 1/2 씩 Serial dilution 합니다. (0, 390, 781, 1562, 3125, 6150, 12500, 25000)
- ⑤ 실험 조건에 맞게 적절한 시간 동안 배양합니다. (e.g. 6, 12, 24, 48 h 등 본 실험의 경우와 동일 시간 배양합니다.)
- ⑥ 배양이 끝난 Plate의 High control에 Cell Lysis Solution을 Well 당 10  $\mu$ l씩 넣어줍니다. (Lysis가 잘 되도록 Pipetting 해주거나 상온에서 5 min 동안 반응 시킵니다.)
- ⑦ LDH Reaction mixture를 각 Well에 100  $\mu$ l씩 첨가한 후 섞어줍니다.
- ⑧ Plate를 빛이 차단된 상온에서 30 min 동안 반응시킵니다.
- ⑨ Stop Solution\*\*을 각 Well에 10  $\mu$ l씩 분주하여 부드럽게 섞어준 후 Colorimetric microplate reader를

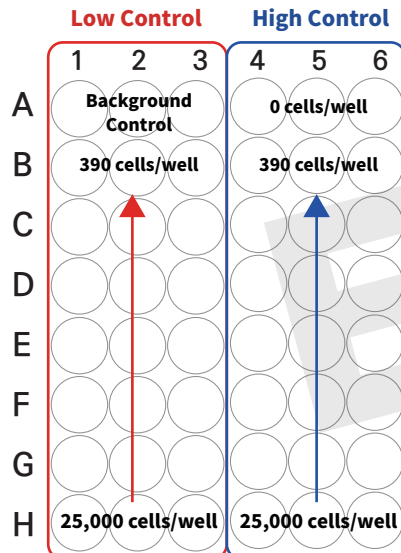
\*\* 세포 수와 반응시간의 최적화 실험에서는 Stop Solution을 사용하는 것을 권장하지 않으며 Colorimetric microplate reader의 Kinetic mode로 측정하여 Low control과 High control의 흡광도 차이가 최대가 되는 적정 세포 수와 반응 시간을 결정합니다.

### Cytotoxicity Assay

- ① 최적화된 세포 수로 96-well Microplate에 50  $\mu$ l(cells/well)씩 분주합니다.  
(For Adherent cells: 37°C, CO<sub>2</sub> Incubator에서 24 h 정도 배양한 후 Medium을 교체합니다.)
- ② 다양한 농도로 준비된 실험 물질을 각 Well에 50  $\mu$ l씩 분주합니다.
- ③ 실험 조건에 맞게 적절한 시간동안 37°C, CO<sub>2</sub> Incubator에서 배양합니다(e.g. 6, 12, 24, 48 h).
- ④ 배양이 끝나면 High control에 Cell Lysis Solution을 Well당 10  $\mu$ l 씩 넣어줍니다.  
(Lysis가 잘되도록 섞어주거나 상온에서 5 min 동안 반응시킵니다.)
- ⑤ LDH Reaction mixture를 각 Well에 100  $\mu$ l씩 첨가한 후 섞어줍니다.
- ⑥ 96-well Microplate를 빛이 차단된 상온에서 30 min 동안\*\* 반응시킵니다.
- ⑦ Stop Solution을 각 Well에 10  $\mu$ l씩 넣고 부드럽게 섞어준 후 Colorimetric microplate reader를 이용하여 490 nm에서 측정합니다.

\*\* 최적화 실험에서 결정된 반응 시간으로 측정합니다.

### Plate 배열 예시



## Multi 측정

### ▶ 세포 수의 최적화

- LDH의 함량은 세포의 종류에 따라 차이가 있으므로 보다 정확한 실험결과를 얻기 위해서는 예비실험을 통하여 최적의 세포의 수와 반응 시간을 결정하는 것을 권장합니다.
- Multi 측정 방법은 Quanti-Max™ (Cell Viability Assay)와 Quanti-LDH™ PLUS (Cytotoxicity Assay)를 모두 측정할 수 있는 방법입니다 (Cell mediated cytotoxicity assay의 경우 Target cell만 예비실험을 진행합니다).

- ① 세포 배양에 사용한 media와 같은 조성의 media를 최적화 실험에 사용하는 모든 well에 100  $\mu$ l 씩 넣어줍니다.
- ② 배양 중인 세포를 모아  $5 \times 10^5$  cells/ml의 세포 용액을 만들어줍니다.
- ③ Low control과 High control을 각 3개씩 설정하여 100  $\mu$ l 씩 ( $5 \times 10^4$  cells/well) 분주합니다.
- ④ 1/2씩 Serial dilution합니다. (0, 390, 781, 1562, 3125, 6150, 12500, 25000 cells/well)
- ⑤ 각 Well에 Medium을 100  $\mu$ l씩 넣어줍니다.
- ⑥ 실험 조건에 맞게 적절한 시간 동안 배양합니다.  
(e.g. 6, 12, 24, 48 h 등 본 실험의 경우와 동일 시간 배양합니다.)
- ⑦ 배양이 끝나면 High control에 Cell Lysis Solution을 Well당 10  $\mu$ l씩 넣어줍니다.  
(Lysis가 잘되도록 섞어주거나 상온에서 5 min 동안 반응시킵니다)
- ⑧ Suspension cells인 경우는 250 x g 에서 2 min 동안 Centrifuge 해줍니다.
- ⑨ 각 Well의 상층액 100  $\mu$ l를 새로운 96-well Microplate에 옮깁니다.
- ⑩ LDH Reaction mixture를 각 Well에 100  $\mu$ l씩 첨가한 후 섞어줍니다.
- ⑪ 96-well Microplate를 빛이 차단된 상온에서 30 min 동안\*\* 반응시킵니다.
- ⑫ Stop Solution\*\*을 각 Well에 10  $\mu$ l씩 넣고 부드럽게 섞어준 후 Colorimetric microplate reader를 이용하여

\*\* 세포 수와 반응 시간의 최적화 실험에서는 Stop Solution을 사용하는 것을 권장하지 않으며 Colorimetric microplate reader의 Kinetic mode로 측정하여 Low control과 High control의 흡광도 차이가 최대가 되는 적정 세포 수와 반응 시간을 결정합니다.

## Cytotoxicity Assay

- ① 최적화된 세포 수로 96-well Microplate에 50  $\mu$ l(cells/well)씩 분주합니다.  
(For Adherent cells : 37°C, CO<sub>2</sub> Incubator에서 24 h 정도 배양한 후 Medium을 교체합니다.)
- ② 다양한 농도로 준비된 실험 물질을 각 Well에 50  $\mu$ l씩 분주합니다.
- ③ 실험 조건에 맞게 적절한 시간동안 37°C, CO<sub>2</sub> Incubator에서 배양합니다(e.g. 6, 12, 24, 48 h).
- ④ 배양이 끝나면 High control에 Cell Lysis Solution을 Well당 10  $\mu$ l씩 넣어줍니다.  
(Lysis가 잘되도록 섞어주거나 상온에서 5 min 동안 반응시킵니다)
- ⑤ 각 Well의 상층액 100  $\mu$ l를 새로운 96-well Microplate에 옮겨줍니다.
- ⑥ LDH Reaction mixture를 각 Well에 100  $\mu$ l씩 첨가한 후 섞어줍니다.
- ⑦ 96-well Microplate를 빛이 차단된 상온에서 30 min 동안 \*\* 반응시킵니다.
- ⑧ Stop Solution을 각 Well에 10  $\mu$ l씩 넣고 부드럽게 섞어준 후 Colorimetric microplate reader를 이용하여 490 nm에서 측정합니다.

\*\* 최적화 실험에서 결정된 반응 시간으로 측정합니다.

## 결과 분석

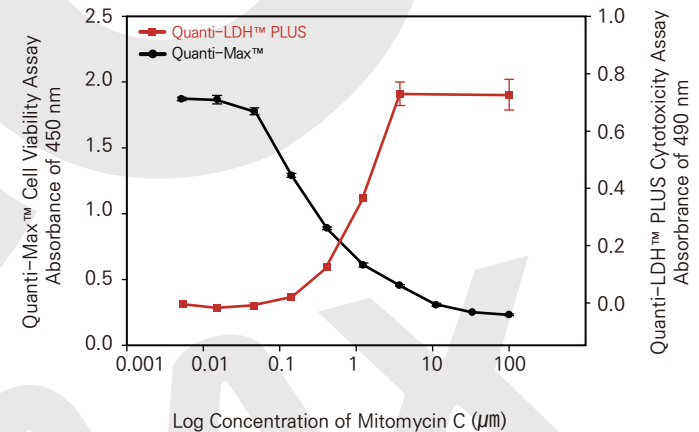
- 측정된 Low control, High control, Exp. 값에서 Background control 값을 빼서 아래 계산식으로 Cytotoxicity(%)를 계산합니다.
- 일부 특정 조성이 포함된 media의 경우 Low control 값이 Background 값보다 낮을 수 있습니다. 이럴 경우 Background 값을 무시하고 결과 분석을 진행합니다.

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

A: Exp. – Background control

B: Low control – Background control

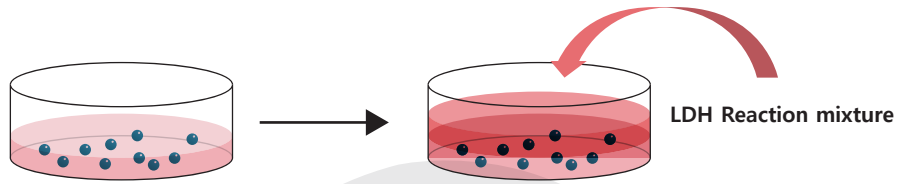
C: High control – Background control



Mitomycin C을 처리한 HeLa cell의 Viability와 Cytotoxicity.

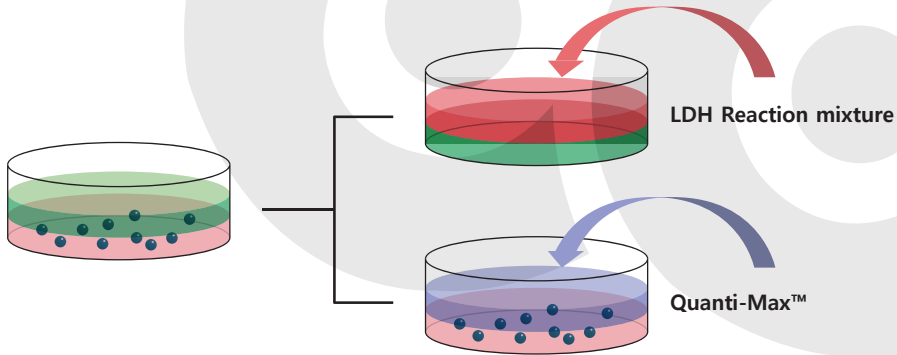
## Summary

Single 측정 : Cytotoxicity Assay 만 측정



LDH Reaction mixture를 각 Well에 100  $\mu$ l씩 넣어 Cytotoxicity Assay 측정

Single 측정 : Cytotoxicity Assay 만 측정



상층액 100  $\mu$ l는 새로운 96-well Microplate에 옮겨 LDH Reaction mixture를 각 Well에 100  $\mu$ l씩 넣어 Cytotoxicity Assay 측정하고 Cell이 남아있는 96-well Microplate는 Quanti-Max™를 처리하여 Cell Viability Assay를 동시에 측정 가능

### Related product

QM1000/2500  
BCV-R1000/3000  
BCV-F500/1000  
BDA-1000

Quanti-Max™ WST-8 Cell Viability Assay Kit  
MAX-Blue™ Cell Viability Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric)  
MAX-Fluor™ Cell Viability Assay Kit (Fluorometric)  
MAX-View™ Live/Dead Cell Staining Kit (Fluorometric)

\* 안전한 사용을 위해 유해물질 정보는 MSDS를 참조하십시오.