

# Dyne LDH PLUS Cytotoxicity Assay Kit

(GBL-P500/P1000 tests, Store at 4°C)

## 개요

세포의 사멸은 Apoptosis와 Necrosis가 존재합니다. 보통 apoptosis의 경우 세포막에 둘러싸인 apoptotic body를 형성한 후 대식세포에 의해 제거됩니다. 그러나 necrosis의 경우 독성, 물리적 상해로부터 일어나는 수동적 세포 사멸 과정으로 세포막이 파괴되어 내부 물질이 세포 외부로 방출됩니다. 화학적 또는 물리적 충격에 의해 손상되거나 죽은 세포에서 방출되는 Lactate dehydrogenase (LDH)는 세포질에 존재하는 안정한 enzyme으로 세포막을 통과하지 못하여 세포 밖으로 배출되지 않으나 세포막이 손상되거나 세포가 죽는 경우에는 세포 외부로 방출됩니다. 배지 중의 LDH의 양은 죽거나 상해를 입은 세포의 수와 비례하게 됩니다. Dyne LDH PLUS Cytotoxicity Assay Kit는 세포에서 방출되는 LDH를 water soluble tetrazolium salt (WST)를 이용하여 흡광도 (490 nm)에서 cytotoxicity assay를 간편하고 빠르게 측정 가능합니다.

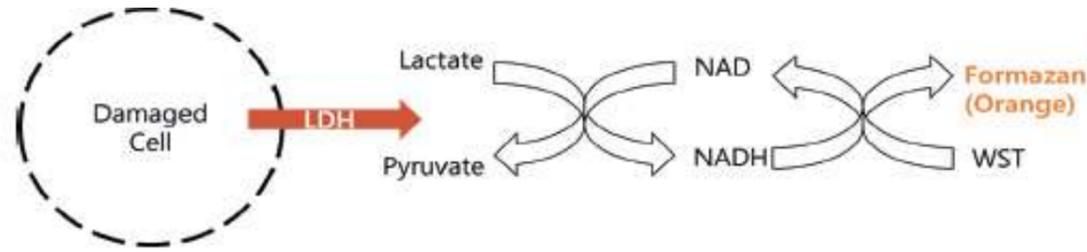


그림1. Cytotoxicity 측정의 원리

## 제품의 구성 및 보관 조건

Cat No.	Components	Size	Storage
GBL-P500 (500 tests)	LDH Assay Buffer	50 ml	4 °C
	WST Substrate Mix	1 Bottle	
	Cell Lysis Solution	5 ml	
	Stop Solution	5 ml	

▶ GBL-P1000 Components : GBL-P500 x 2

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

## 검사 필요 장비 및 소모품

- 1) 8 또는 12 채널 마이크로 피펫
- 2) Sterile pipette tips
- 3) CO2 incubator (37°C)
- 4) 96-well plate (Cell culture grade, Flat bottom)
- 5) Microplate reader (490 nm filter)
- 6) Medium: 10% FBS가 함유된 media를 사용하여 실험을 진행합니다. Background를 낮추고 싶은 경우, Serum-free 배지를 사용하시거나, 혹은 FBS의 함량을 낮추어 사용하시면 됩니다.

## 실험 프로토콜

### 1. LDH PLUS Reaction Mixture 제작

- 1) WST Substrate Mix의 bottle에 LDH Assay Buffer를 5ml 넣어 녹여줍니다
  - 2) WST Substrate Mix가 충분히 녹으면 이 혼합액 전부를 45ml이 남아있는 LDH Assay Buffer의 bottle로 다시 옮겨줍니다. (LDH PLUS Reaction Mixture 제작 완료)
- \* LDH PLUS Reaction Mixture는 4°C에서 6 개월동안 보관하며 사용 가능합니다.  
\* 1000T kit의 경우 WST Substrate Mix와 LDH Assay Buffer가 각각 2 bottle씩 있으므로 이 과정을 두 번 진행하게 됩니다.

### 2. Control 준비

적정 세포 수와 반응시간을 정하기 위한 예비 실험에 필요한 control은 다음과 같습니다.

- 1) Background control: Medium의 FBS에 포함되어 있는 LDH를 측정합니다.
- 2) Low control: 실험 과정 중 자연적으로 죽거나 손상된 세포에서 방출되는 LDH를 측정합니다.
- 3) High control: 실험에 사용된 세포에 Cell Lysis Solution 10  $\mu$ l를 첨가하여 세포를 인위적으로 사멸시켜 세포에서 방출 가능한 최대의 LDH를 측정합니다.

### 3. General Protocol - Single 측정

#### 세포 수의 최적화

LDH의 함량은 세포의 종류에 따라 차이가 있으므로 보다 정확한 실험결과를 얻기 위해서는 예비실험을 통하여 최적의 세포 수를 결정하는 것을 권장합니다.

(Cell mediated cytotoxicity assay의 경우 Target cell만 예비실험을 진행합니다)

- 1) 배양 중인 세포를 모아  $5 \times 10^5$  cells/ml의 세포 현탁액을 준비합니다.
- 2) Low control과 High control을 각 3개씩 설정하여 100  $\mu$ l씩 ( $5 \times 10^4$  cells/well) 분주합니다.
- 3) 1/2씩 serial dilution 합니다. (0, 390, 781, 1562, 3125, 6150, 12500, 25000)
- 4) 실험 조건에 맞게 적절한 시간 동안 배양합니다. (e.g. 6, 12, 24, 48 시간 등 본 실험의 경우와 동일 시간 배양합니다)
- 5) 배양이 끝난 plate의 High control에 Cell Lysis Solution을 well 당 10  $\mu$ l씩 넣어줍니다. (Lysis가 잘 되도록 pipetting 해주거나 상온에서 5분동안 반응시킵니다)

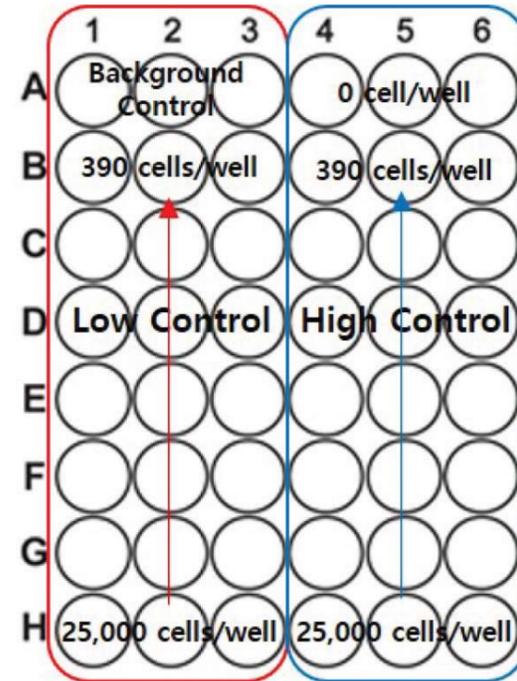


그림2. Plate 배열 예시

- 6) LDH PLUS Reaction Mixture를 각 well에 100  $\mu$ l씩 첨가한 후 섞어줍니다.
- 7) Plate를 빛이 차단된 상온에서 30분동안\* 반응시킵니다.
- 8) Stop Solution\*을 각 well에 10  $\mu$ l씩 분주하여 부드럽게 섞어준 후 Microplate reader를 이용하여 490 nm에서 측정합니다.

\* 세포 수와 반응시간의 최적화 실험에서는 Stop Solution을 사용하는 것을 권장하지 않으며 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 plate에 50  $\mu$ l씩 분주합니다. (cells/well)  
(For adherent cells: 37°C, CO2 incubator에서 24시간정도 배양한 후 medium을 교체합니다.)
- 2) 다양한 농도로 준비된 실험 물질을 각 well에 50  $\mu$ l씩 분주합니다.
- 3) 실험 조건에 맞게 적절한 시간동안 37°C, CO2 incubator에서 배양합니다. (e.g. 6, 12, 24, 48 시간)
- 4) 배양이 끝나면 High control에 Cell Lysis Solution을 well당 10  $\mu$ l씩 넣어줍니다. (Lysis가 잘되도록 섞어주거나 상온에서 5분동안 반응시킵니다.)
- 5) LDH PLUS Reaction Mixture를 각 well에 100  $\mu$ l씩 첨가한 후 섞어줍니다.
- 6) Plate를 빛이 차단된 상온에서 30분동안\* 반응시킵니다.
- 7) Stop Solution을 각 well에 10  $\mu$ l씩 넣고 부드럽게 섞어준 후 Microplate reader를 이용하여 490 nm에서 측정합니다

\* 최적화 실험에서 결정된 반응 시간으로 측정합니다.

## 4. General Protocol - 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 Dyne WST-8 Cell Viability Assay와 Dyne LDH PLUS Cytotoxicity Assay를 모두 측정할 수

있는 방법입니다. (Cell mediated cytotoxicity assay의 경우 target cell만 예비실험을 진행합니다.)

- 1) 배양 중인 세포를 모아  $5 \times 10^5$  cells/ml의 세포 현탁액을 만들어줍니다.
- 2) Low control과 High control을 각 3개씩 설정하여  $100 \mu\text{l}$ 씩 ( $5 \times 10^4$  cells/well) 분주합니다.
- 3) 1/2씩 serial dilution합니다. (0, 390, 781, 1562, 3125, 6150, 12500, 25000)
- 4) 각 well에 medium을  $100 \mu\text{l}$ 씩 넣어줍니다.
- 5) 실험 조건에 맞게 적절한 시간 동안 배양합니다. (e.g. 6, 12, 24, 48 시간 등 본 실험의 경우와 동일 시간 배양합니다.)
- 6) 배양이 끝나면 High control에 Cell Lysis Solution을 well당  $20 \mu\text{l}$ 씩 넣어줍니다. (Lysis가 잘되도록 섞어주거나 상온에서 5분 동안 반응시킵니다.)
- 7) Suspension cells인 경우는  $250 \times g$ 에서 2분 동안 centrifuge 해줍니다.
- 8) 각 well의 상층액  $100 \mu\text{l}$ 를 새로운 96-well plate에 옮깁니다.
- 9) LDH PLUS Reaction Mixture를 각 well에  $100 \mu\text{l}$ 씩 첨가한 후 섞어줍니다.
- 10) Plate를 빛이 차단된 상온에서 30분동안\* 반응시킵니다.
- 11) Stop Solution\*을 각 well에  $10 \mu\text{l}$ 씩 넣고 부드럽게 섞어준 후 Microplate reader를 이용하여 490 nm에서 측정합니다.

\* 세포 수와 반응 시간의 최적화 실험에서는 Stop Solution을 사용하는 것을 권장하지 않으며 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 plate에  $100 \mu\text{l}$ 씩 분주합니다. (cells/well)  
(For adherent cells:  $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  incubator에서 24시간정도 배양한 후 medium을 교체합니다.)
- 2) 다양한 농도로 준비된 실험 물질을 각 well에  $100 \mu\text{l}$ 씩 분주합니다.
- 3) 실험 조건에 맞게 적절한 시간동안  $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  incubator에서 배양합니다.(e.g. 6, 12, 24, 48 시간)
- 4) 배양이 끝나면 High control에 Cell Lysis Solution을 well당  $20 \mu\text{l}$ 씩 넣어줍니다. (Lysis가 잘되도록 섞어주거나 상온에서 5분동안 반응시킵니다.)
- 5) 각 well의 상층액  $100 \mu\text{l}$ 를 새로운 96-well plate에 옮깁니다.
- 6) LDH PLUS Reaction Mixture를 각 well에  $100 \mu\text{l}$ 씩 첨가한 후 섞어줍니다.
- 7) Plate를 빛이 차단된 상온에서 30분동안\* 반응시킵니다.
- 8) Stop Solution을 각 well에  $10 \mu\text{l}$ 씩 넣고 부드럽게 섞어준 후 Microplate reader를 이용하여 490 nm에서 측정합니다.

\* 최적화 실험에서 결정된 반응 시간으로 측정합니다.

## 결과분석

- 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

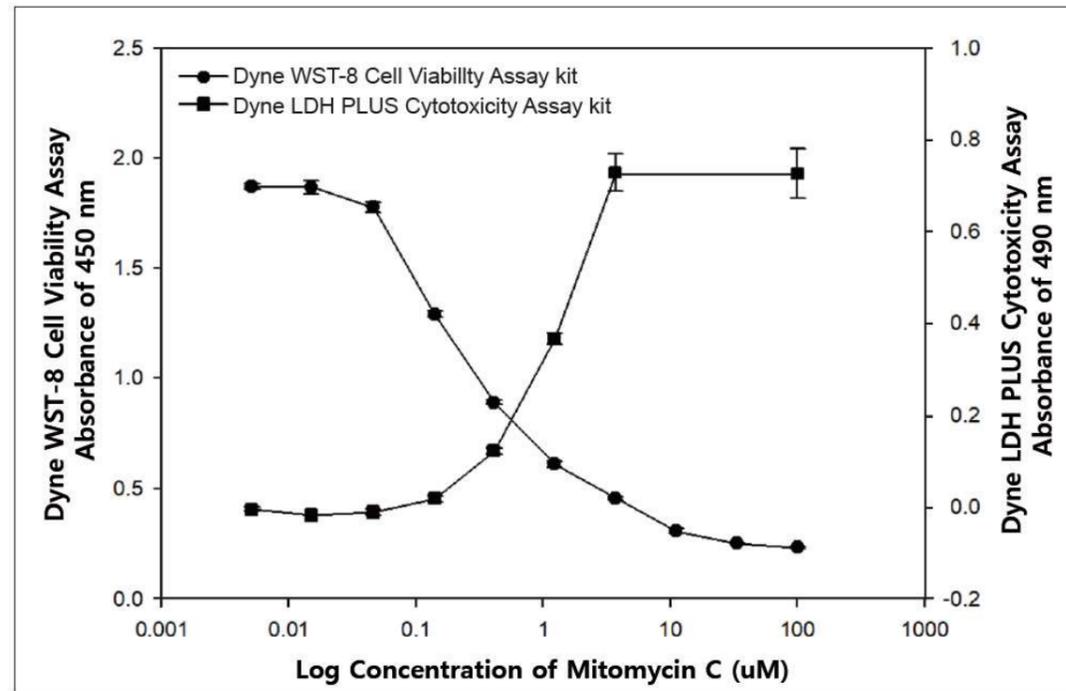
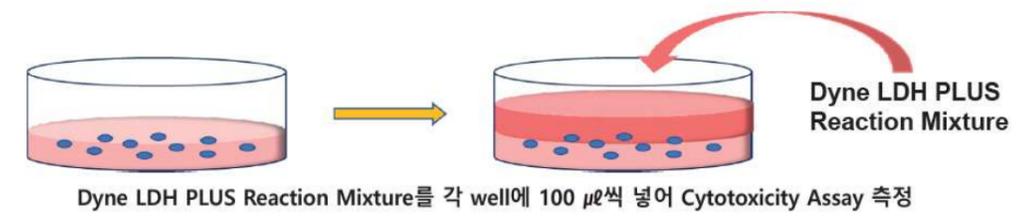
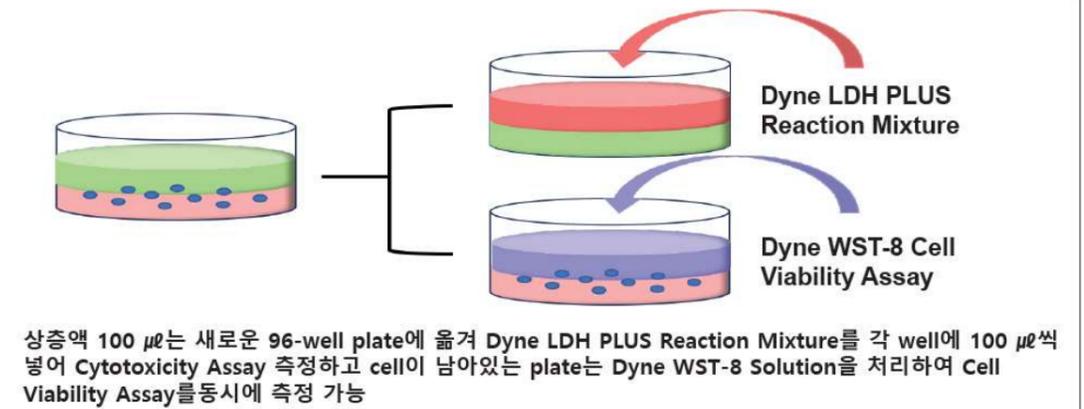


그림 3. Mitomycin C을 처리한 HeLa cell의 viability와 cytotoxicity. HeLa cell을 1 x 10<sup>4</sup> cells/well로 plate에 처리 후 24시간 배양하여 Mitomycin C를 농도별 처리해서 48시간 배양한 뒤 cell viability와 cytotoxicity를 Multi 측정 방법을 이용하여 확인함.

### Single 측정: Cytotoxicity Assay 만 측정



### Multi 측정: Cell Viability Assay와 Cytotoxicity Assay 모두 측정



## Related Products

- GBW-1000/2500 Dyne WST-8 Cell Viability Assay Kit 1000/2500 tests
- GBV-1000 Dyne Live/Dead Cell Staining Kit (Fluorometric) 1000 tests
- GBL-500/1000 Dyne LDH Cytotoxicity Assay Kit (Colotimetric) 500/1000 tests