

製品コード MK401

研究用

Takara

**LDH Cytotoxicity
Detection Kit**

説明書

v201906

細胞死は従来より細胞膜の傷害を定量することにより決定されており、感度や確実性、自動化の必要性からいくつかの標準法が開発されました。広く用いられている標準的な方法は、トリパンプルーやエオジンYなどの色素の取込みや排除を基本としていますが、多数のサンプルを処理できない、傷害をうけた死細胞は定量できない、などの問題点があります。¹⁻⁴⁾

次に標準的な方法は、放射性物質や蛍光物質であらかじめ標識した目的の細胞からそれらが放出される量を測定するものです。⁵⁻⁸⁾しかし、この方法は、目的の細胞をあらかじめ標識する必要がある、自然に放出される標識物質がある、などの問題点があります。

3番目の方法として、傷害をうけた細胞から放出される細胞質酵素の活性を測定する方法で、酵素活性量は傷害をうけた細胞の割合と相関します。⁹⁻¹²⁾アルカリホスファターゼや酸ホスファターゼ、GOT、GPTなどが用いられていますが、細胞に少量しか存在していないことや、複雑な測定法が必要とされるなどにより、普及していません。しかし、これらの酵素とは対照的に、乳酸脱水素酵素 (LDH) は、すべての細胞に安定して存在する細胞質酵素で、細胞膜が傷害をうけるとすぐに培養上清中に放出されます。本製品は、培養上清中の LDH 活性が簡単に測定でき、マイクロプレートリーダーを用いて多数のサンプルを同時に処理することが可能です。

I. 原理と応用

本製品は、 $[^3\text{H}]$ -チミジン放出法や $[^{51}\text{Cr}]$ 放出法に代わる Non-RI 法として、傷害をうけた細胞の懸濁液上清中に放出される乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性を測定することを基にした、細胞の死と傷害を定量する比色測定法としてデザインされている。培養上清と本キット中の反応混合液を反応させて、LDH の活性を測定する。

反応の第1段階で、乳酸が LDH の触媒によりピルビン酸に変化し、その結果、 NAD^+ が NADH/H^+ になる。第2段階で、触媒 (diaphorase) により、 NADH/H^+ から H/H^+ が黄色テトラゾリウム塩 INT (2-[4-indophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazolium chloride) に移動して、赤色ホルマザンとなる (図 1)。

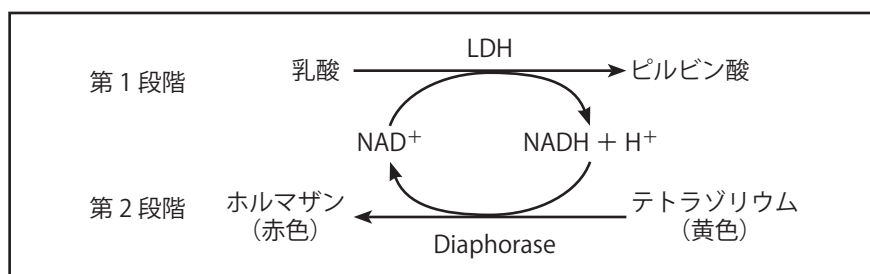


図 1. 測定原理

死細胞または細胞膜に傷害をうけた細胞の数の増加は、培養上清中の LDH 酵素活性の増加として現われる。また、培養上清中の LDH 酵素活性の増加は、一定の時間内に作られたホルマザンの量と直線的に相関する。すなわち、反応で作られたホルマザン色素の量は傷害をうけた細胞数と比例することになる。生成されたホルマザン色素は、水溶性で、約 500 nm で最大吸収を示すが、テトラゾリウム塩 INT はこの波長での吸収を示さない (図 2)。

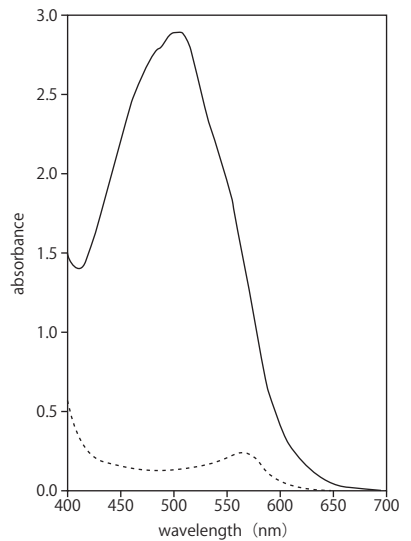


図 2. LDH Cytotoxicity Detection Kit の反応液の吸収曲線
 1% BSA を含む RPMI1640 に本キットの反応液を加えて測定した吸収曲線
 ——— ; LDH の存在するとき
 - - - - ; LDH の存在しないとき

本製品は、細胞膜に傷害が起こったときの *in vitro* における多くの異なる細胞システムに利用できる。

例えば—

- CTL、NK 細胞、LAK 細胞や単球により引き起こされる細胞性細胞傷害検出と定量¹²⁻¹³⁾
- 細胞傷害を引き起こす伝達物の決定¹²⁾
- 抗体依存性細胞障害性 (ADCC) や補体が介在する細胞溶解の測定
- 環境や医学研究において、または、食物・化粧品・薬剤製造過程の化合物にある細胞傷害性の決定¹⁴⁻²¹⁾
- bioreactors 中の細胞死の決定²²⁻²⁴⁾

本製品は、培地中に放出される細胞質中の LDH 酵素活性を測定することにより、bioreactors における発酵中の細胞死を正確に評価でき、effector-target 細胞システムに使われている ⁵¹Cr 放出測定法ともよく相関する。

II. 特長

- 安全 放射性同位元素を使用していません。
- 正確 傷害を受けた細胞数と強く相関します。(図 3)
- 感度 少ない細胞数でも検出できます。
細胞の種類にもよりますが、 $0.2 \sim 2 \times 10^4$ cells/ ウェルで、ほとんどの実験系において十分な感度が得られています。(図 3)
- 迅速 マイクロプレートリーダーの使用により、多数のサンプルを同時に処理できます。また、培養上清を集める時間と基質を反応させる時間を含めて、0.5 ~ 1 時間と短時間の測定が可能です。
- 便利 前標識や洗浄の step が必要なく、放射性同位元素の処分や放射性物質取扱上の書類事務もありません。

III. 内容 (2,000 回分)

- | | |
|--|-------------------|
| 1. Catalyst (Diaphorase/NAD+) (青キャップ) | 凍結乾燥品 × 5 bottles |
| 2. Dye solution (INT/Na-lactate) (赤キャップ) | 45 ml × 5 bottles |

IV. 保存

– 20℃

- 1 度溶解した Catalyst 溶液は、4℃保存で数週間安定です。
- 1 度融解した Dye Solution は、4℃保存で数週間安定です。

V. 測定準備

V-1. 使用上の注意

1. 測定阻害

以下の場合には測定を阻害する可能性があります。

- ・血清または測定物質中に LDH が存在するとき (「V-2.2.」、 「V-4.」 参照)。
- ・細胞性細胞傷害の測定において、傷害をうけた effector 細胞から放出される LDH が存在するとき (「V-4.」、 「VI-2.」 参照)。
- ・LDH または diaphorase の酵素活性を阻害する物質を含むとき (「V-4.」 参照)。

2. 検体の種類

細胞を含まない培養上清(約250×gの遠心で細胞を取り除く)を使用してください。通常、この培養上清はLDHの活性が低下することなく、4℃で数日間保存できます。

V-2. 本キット以外に必要な器具、試薬類

1. 器具

- ・37℃インキュベーター
- ・96 ウェルプレートに対応するローターをもつ遠心機
- ・490～492 nm のフィルターをもつマイクロプレートリーダー (対照波長を使うのならば、600 nm 以上のフィルターが必要)
- ・顕微鏡
- ・血球計算盤
- ・マイクロピペット (100 μl)
- ・滅菌済ピペットチップ
- ・96 ウェルプレート
 - 細胞を培養するときに使用するもの：細胞培養用
浮遊細胞—丸底またはV底
 - 接着細胞—平底
 - 発色するときに使用するもの：ELISA 用

2. 試薬

- ・測定培地
ヒトや動物の血清はLDHを含むので、測定においてバックグラウンドの吸光度を増加させます。したがって、低血清濃度(例えば1%以下)での使用や血清の代わりに1% BSA (w/v) の使用をお勧めします。
- ・Triton X-100 溶液(測定培地で2%溶液とする)
Triton X-100 溶液(最終濃度1%)を添加して細胞に傷害をおこさせることにより、放出されるLDH酵素活性の最大量を決定できます。この濃度ではLDH活性には影響を与えません。
- ・HCl 反応停止液(1 N)
反応停止液を加えなくても反応産物を測定することはできますが、反応停止液を50 μl/ウェル(最終濃度0.2 N HCl) 加えることにより酵素反応を停止することができます。
- ・LDH 標準液
放出されたLDHの活性をパーセントまたは吸光度での相対的な値よりU/mlで計算させるのならば、LDH標準液を使って検量線を作成してください。

V-3. 反応混合液の調製

1. Solution A : Catalyst (青キャップ)
凍結乾燥品 1 本に蒸留水 1 ml を加え 10 分間混合し、完全に溶解させる。
溶解した Catalyst 溶液は 4°C で数週間安定です。
2. Solution B : Dye Solution (赤キャップ)
凍結している Dye Solution を融解し、そのまま使用する。
1 度融解した Dye Solution は 4°C で数週間安定です。
3. Solution C : 反応混合液
100 回分：使用直前に 250 μ l の Solution A と 11.25 ml の Solution B を混合する。*
400 回分：使用直前に Solution A 全量 (1 ml) と Solution B 全量 (45 ml) を混合する。*
*：反応混合液は保存できないので、必ず使用直前に調製すること。

V-4. コントロールの設定

パーセント細胞傷害を計算するために、それぞれの実験系において以下の 1. ~ 3. のコントロールを行う (表 1 参照)。

1. バックグラウンドコントロール
測定する培地に含まれる LDH 活性を測定する。このコントロールで得られた吸光度の値を他で得られたすべての値から差し引く。
2. 低コントロール
無処理の細胞から放出される LDH 活性、要するに、自然に放出される LDH 活性を測定する。
3. 高コントロール
細胞から放出される最大の LDH 活性、要するに、Triton X-100 溶液の添加により最大に放出される LDH の活性を測定する。

次の 2 つのコントロールは任意で設定する。

4. 物質コントロール I
測定物質に含まれる LDH 活性を示す。細胞性細胞傷害を測定するとき、このコントロールは effector 細胞から放出される LDH 活性を示す。
5. 物質コントロール II
測定物質自身が LDH 活性を妨げているかどうかを示す。このコントロールは以下の方法で測定する。
マイクロプレートリーダー測定用 96 ウェルプレートの 3 カ所に、測定培地で希釈した測定物質溶液を 50 μ l/ ウェル入れて、LDH 標準液 (0.05 U/ml) を 50 μ l/ ウェル加える。次に Solution C を 100 μ l/ ウェル加えてマイクロプレートリーダーを用いて吸光度を測定する。50 μ l/ ウェルの LDH 溶液 (0.05 U/ml)、50 μ l/ ウェルの測定培地、100 μ l/ ウェルの反応混合液を混合したものをコントロールとし、その吸光度と測定した吸光度とを比較して測定する。

表 1. コントローラー一覧

ウェルの内容物	バックグラウンド コントロール	低コントロール	高コントロール	物質コントロール I	物質コントロール II	実験系
測定培地	200 μ l	100 μ l	—	100 μ l	(50 μ l)	—
細胞	—	100 μ l	100 μ l	—	—	100 μ l
Triton X-100 溶液 (測定培地中に 2%となるよう に調製する)	—	—	100 μ l	—	—	—
測定物質または effector 細胞	—	—	—	100 μ l	50 μ l	100 μ l
LDH 標準液	—	—	—	—	50 μ l	—

V-5. 細胞傷害の計算方法

1. 細胞傷害の割合の決定

実験値、コントロール値とも吸光度を 3 連で測定し、その平均値を求める。それぞれの平均値よりバックグラウンドコントロールで得た吸光度の平均値を引く。その結果を次の等式に代入する。

$$\text{細胞障害 (\%)} = \frac{\text{実験値} - \text{低コントロール}}{\text{高コントロール} - \text{低コントロール}} \times 100$$

2. 細胞性細胞傷害の割合の決定

実験値、コントロール値とも吸光度を 3 連で測定し、その平均値を求める。それぞれの平均値よりバックグラウンドで得た吸光度の平均値を引く。その結果を次の等式に代入する。

$$\text{細胞障害 (\%)} = \frac{A - \text{低コントロール}}{\text{高コントロール} - \text{低コントロール}} \times 100$$

$$A = (\text{effector-target の細胞混合} - \text{effector 細胞コントロール})$$

V-6. 予備実験 (最適な target 細胞の濃度の決定)

細胞の種類によって LDH の含有量が異なるため、あらかじめ、最適な細胞濃度を予備実験で決定する必要がある。一般に、この最適な細胞濃度は、低コントロールと高コントロールの差が最大となるところに設定する。ほとんどの細胞系では、最適細胞濃度は、 $0.5 \sim 2 \times 10^4$ cells/200 μ l/ウェル (= $0.25 \sim 1.0 \times 10^5$ cells/ml) の範囲内になる。

測定方法

- (1) 細胞培養用 96 ウェルプレートの全てのウェル (バックグラウンドコントロールを除く) に測定培地を 100 μ l ずつ加える。
- (2) 細胞を測定培地で洗浄した後、 2×10^6 cells/ml 濃度の細胞懸濁液を測定培地を用いて調製する。

- (3) この細胞懸濁液の2倍段階希釈系列を(1)のプレート上にする(3ウェルを1組とする;表2参照)。まず、測定培地 100 μ l を含む B1 ~ B3 (B7 ~ B9) のウェルに細胞懸濁液をマイクロピペットを用いて 100 μ l ずつ加え、混合する(希釈1;表2参照)。次にこれらのウェルから希釈細胞懸濁液を 100 μ l ずつ取り、測定培地 100 μ l が入っている C1 ~ C3 (C7 ~ C9) のウェルに移して混合する(希釈2;表2参照)。同様の操作を希釈 14 まで 14 回行う。

表 2. 最適細胞濃度の測定; 96 ウェルプレートの配置

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	バックグラウンド コントロール											
B	細胞懸濁液 希釈 1			希釈 8			細胞懸濁液 希釈 1			希釈 8		
C	希釈 2			希釈 9			希釈 2			希釈 9		
D	希釈 3			希釈 10			希釈 3			希釈 10		
E	希釈 4			希釈 11			希釈 4			希釈 11		
F	希釈 5			希釈 12			希釈 5			希釈 12		
G	希釈 6			希釈 13			希釈 6			希釈 13		
H	希釈 7			希釈 14			希釈 7			希釈 14		

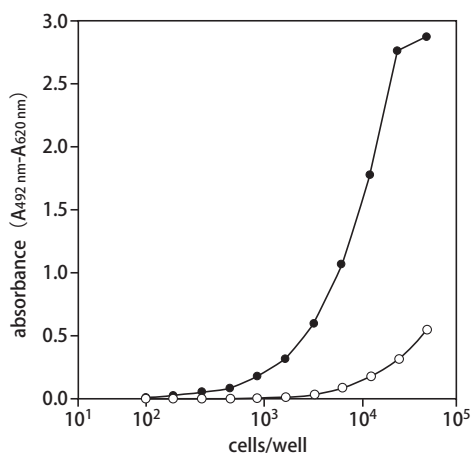
┌──────────────────┴──────────────────┐
┌──────────────────┴──────────────────┐
 低コントロール高コントロール
(3つのウェルを1組としてテストする)

- (4) プレート上に以下のコントロールを作る。
- 1) バックグラウンドコントロール: 3 ウェルに測定培地を 200 μ l ずつ加える。(表 2; A1 ~ A3)
 - 2) 低コントロール (=自然に放出される LDH): 希釈細胞懸濁液を 100 μ l 含むプレートの左半分のウェル(表 2; B ~ H の 1 ~ 6) に測定培地を 100 μ l ずつ加える。
 - 3) 高コントロール (=最大に放出される LDH): 希釈細胞懸濁液を 100 μ l 含むプレートの右半分のウェル(表 2; B ~ H の 7 ~ 12) に Triton-X 溶液を 100 μ l ずつ加える。
- (5) 本実験に用いるのと同じ時間、培養条件(37°C、5% CO₂、90%湿度)で細胞を培養する。
- (6) 培養後、250 × g で 10 分間、96 ウェルプレートを遠心する。
- (7) 上清を注意深く、100 μ l/ウェルずつ取って(細胞の沈殿を乱さない)ELISA 用 96 ウェルプレート上の対応したウェルに移す。
- (8) 得られた上清中の LDH 活性を決定するために、それぞれのウェルに Solution C を 100 μ l ずつ加えて、室温で 30 分間、静置する。この間、プレートは遮光しておく。
- (9) マイクロプレートリーダーを用いて、490 または 492 nm でサンプルの吸光度を測定する。対照波長は 600 nm 以上にする。

図 3. K562 細胞における最適な細胞濃度の決定

V-6. (3) で希釈した K562 の細胞濃度を横軸に示した。

- (○) 自然に放出される LDH 活性を決定するために測定培地を加えた (低コントロール)。
 - (●) 最大に放出される LDH 活性を決定するために Triton X-100 を最終濃度 1% で加えた (高コントロール)。
- この実験における最適細胞濃度は約 1×10^4 cells/ ウェルである。



VI. 操作方法

Step	操作方法	液量/ウェル	条件 (温度、時間等)
1	Target 細胞を測定物質あるいは、細胞傷害性 Effector 細胞とともに培養する。	200 μ l	37°C、4 ~ 24 時間
2	96 ウェルプレートごと細胞を遠心する。		250 \times g、10 分間
3	細胞上清を ELISA 用の 96 ウェルプレートに移す。	100 μ l	
4	Solution C を加えて LDH と反応させる。	100 μ l	室温、約 10 ~ 30 分間、遮光すること
5	反応を停止する場合、1 N HCl をそれぞれのウェルに加える。	50 μ l	
6	約 490 nm で吸光度を測定する。 (対照波長 600 nm 以上)		

VI-1. 可溶性物質の細胞傷害活性の測定

1. 細胞懸濁液での測定方法

- (1) 測定物質 (mediators、細胞溶解性または細胞傷害性物質) を測定培地で 2 倍ずつ段階希釈し、それぞれの希釈液を細胞培養用 96 ウェルプレートの所定のウェルに 100 μ l ずつ加える (3 ウェルを 1 組とする; 表 3 参照)。
- (2) 測定培地で細胞を洗浄した後、予備実験で決定した最適濃度の細胞懸濁液を測定培地を用いて調製する。
- (3) 希釈した測定物質 100 μ l を含むウェル (1) に、この最適濃度の細胞懸濁液を 100 μ l ずつ加える。
- (4) プレート上に以下のコントロールを作る (表 3 参照)。
 - 1) バックグラウンドコントロール: 3 ウェルに測定培地を 200 μ l ずつ加える。
 - 2) 低コントロール (= 自然に放出される LDH): 3 ウェルにそれぞれ細胞懸濁液と測定培地を 100 μ l ずつ加える。
 - 3) 高コントロール (= 最大に放出される LDH): 3 ウェルにそれぞれ細胞懸濁液と Triton-X 溶液を 100 μ l ずつ加える。
 - 4) 物質コントロール I: 3 ウェルにそれぞれ測定培地と測定物質 (測定に用いる最大の濃度のもの) を 100 μ l/ウェル加える。
- (5) 37°C、5% CO₂、90%湿度、の条件で細胞を培養する (2 ~ 24 時間)。
- (6) 培養後、250 \times g で 10 分間、96 ウェルプレートを遠心する。
- (7) 上清を 100 μ l/ウェル 注意深く取って (細胞の沈殿を乱さないよう注意する)、ELISA 用 96 ウェルプレート上の対応するウェルに移す。
- (8) それぞれのウェルに Solution C を 100 μ l 加えて、室温で 30 分間、静置する。この間プレートは遮光しておく。
- (9) マイクロプレートリーダーを用いて、490 nm または 492 nm でサンプルの吸光度を測定する。対照波長は 600 nm 以上とする。
- (10) 傷害を受けた細胞の割合を計算する (「V-5.」参照)。

表 3. 物質 I と II の細胞障害活性の測定; 96 ウェルプレートの配置 3 つのウェルを 1 組としてテストする。

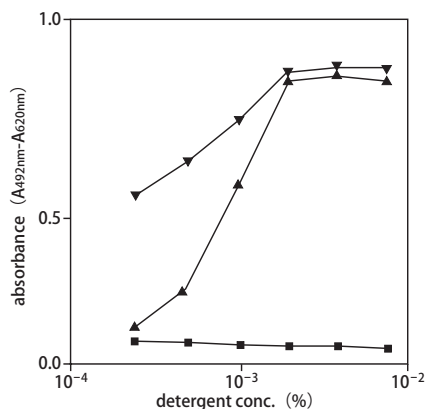
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	バックグラウンド コントロール			物質コントロール I (希釈 1)			物質コントロール II (希釈 1)					
B	測定物質 I 希釈 1			測定物質 I 希釈 8			測定物質 II 希釈 1			測定物質 II 希釈 8		
C	希釈 2			希釈 9			希釈 2			希釈 9		
D	希釈 3			希釈 10			希釈 3			希釈 10		
E	希釈 4			希釈 11			希釈 4			希釈 11		
F	希釈 5			希釈 12			希釈 5			希釈 12		
G	希釈 6			希釈 13			希釈 6			希釈 13		
H	希釈 7			低コントロール			希釈 7			高コントロール		
	測定物質 I の 2 倍希釈系列 + 細胞懸濁液						測定物質 II の 2 倍希釈系列 + 細胞懸濁液					

2. 接着細胞での測定方法

- (1) 測定培地で細胞を洗浄した後、予備実験で決定した濃度に細胞を希釈し、細胞培養用 96 ウェルプレートに細胞懸濁液を 100 μ l/ ウェル加える。バックグラウンドコントロールと物質コントロールIのウェルには細胞を加えない。
- (2) 細胞を確実に接着させるために、細胞をインキュベーター (37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、90%湿度) で1晩、培養する。
- (3) 測定物質を別の 96 ウェルプレート上で、最終液量 200 μ l/ ウェルとなるよう、測定培地で2倍ずつ段階希釈する。
- (4) (2) の培養した接着細胞のウェルから測定培地を取り除いて (1晩培養している間に、接着細胞から放出された LDH 活性を取り除くため)、それぞれのウェルに新しい測定培地を 100 μ l 加える。
- (5) 接着細胞を含む対応するウェルに、(3) の希釈した測定物質を 100 μ l ずつ移す。
- (6) プレート上に以下のコントロールを作る。
 - 1) バックグラウンドコントロール：3 ウェルに測定培地を 200 μ l ずつ加える。
 - 2) 低コントロール (= 自然に放出される LDH)：細胞を 100 μ l 含む 3 ウェルに測定培地を 100 μ l ずつ加える。
 - 3) 高コントロール (= 最大に放出される LDH)：細胞を 100 μ l 含む 3 ウェルに Triton-X 溶液を 100 μ l ずつ加える。
 - 4) 物質コントロールI：測定培地 100 μ l を含む 3 ウェルに測定物質 (測定に用いる最大の濃度のもの) を 100 μ l/ ウェル加える。
- (7) 「VI-1.1」の (5) ~ (10) と同様に測定する。

図 4. 界面活性剤の細胞傷害活性の測定

VI-1.1 (4) のように、Synperonic F68 (■)、Triton X-100 (▲)、NP-40 (▼)、を図に示した最終濃度に測定培地で希釈した。続いて、P815 細胞を最終濃度 1×10^4 cells/ ウェルで加えた。細胞を 18 時間培養後、LDH 活性を求めた。



VI-2. 細胞性細胞傷害活性の測定

- (1) effector 細胞 (NKcells、LAKcells、CTLs) を測定培地を用いて 2 倍ずつ段階希釈し、100 μ l ずつ細胞培養用 96 ウェルプレートに加える。(表 4、希釈 1 ~ 14)
- (2) 測定培地で target 細胞を洗浄した後、予備実験で決定した濃度に細胞を希釈する。
- (3) (1) の effector 細胞の希釈液に (2) の target 細胞懸濁液を 100 μ l/ ウェル加える。(= effector-target 細胞混合液、表 4 参照)
- (4) プレート上に以下のコントロールを作る (表 4 参照)。
 - 1) バックグラウンドコントロール：3 ウェルに測定培地を 200 μ l ずつ加える。
 - 2) 低コントロール (= 自然に放出される LDH)：測定培地を 100 μ l 含む 3 ウェルに target 細胞を 100 μ l ずつ加える。
 - 3) 高コントロール (= 最大に放出される LDH)：Triton-X 溶液を 100 μ l 含む 3 ウェルに target 細胞を 100 μ l ずつ加える。
 - 4) 物質コントロールI (= effector 細胞コントロール = effector 細胞が自然に放出する LDH)：effector 細胞 100 μ l を含む 3 ウェルに測定培地を 100 μ l ずつ加える。
- (5) 「VI-1.1」の (5) ~ (10) と同様に測定する。

表 4. 細胞性細胞傷害の測定；96 ウェルプレートでの配置

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	バックグラウンド コントロール			target 細胞 低コントロール			target 細胞 高コントロール					
B	測定物質 I 希釈 1			測定物質 I 希釈 8			測定物質 II 希釈 1			測定物質 II 希釈 8		
C	希釈 2			希釈 9			希釈 2			希釈 9		
D	希釈 3			希釈 10			希釈 3			希釈 10		
E	希釈 4			希釈 11			希釈 4			希釈 11		
F	希釈 5			希釈 12			希釈 5			希釈 12		
G	希釈 6			希釈 13			希釈 6			希釈 13		
H	希釈 7			希釈 14			希釈 7			希釈 14		
	effector 細胞混合液						effector 細胞コントロール					

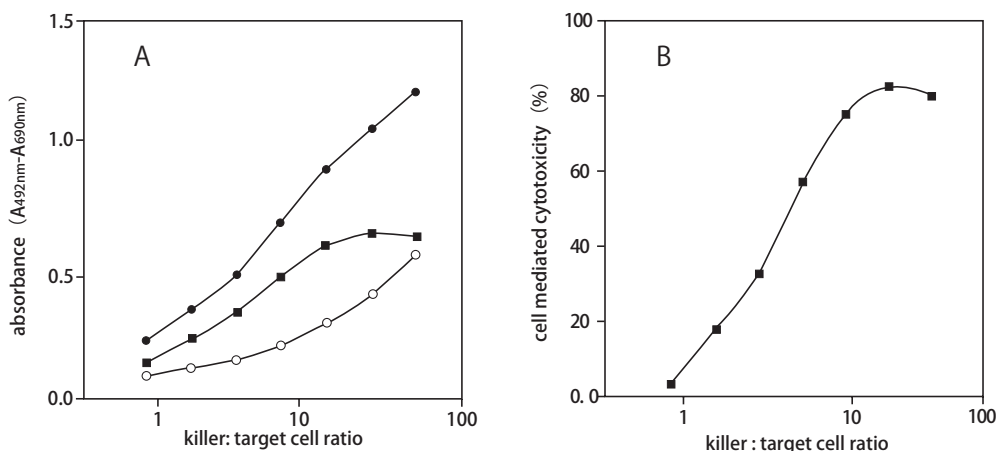


図 5. アロ刺激による細胞傷害 T リンパ球 (CTL) の細胞傷害活性の測定

C57/Bl6 マウスの脾臓細胞 (H-2b) は *in vitro* で P815 細胞 (H-2d) に刺激される。生存 CTL はフィコール密度勾配により精製して洗浄後、VI-1.2 (5) のように 96 ウェルプレートで希釈した。1 × 10⁴ cells/ ウェルの P815 target 細胞に effector 細胞を加えた。細胞を 4 時間培養後、遠心した。その後、培養上清を 100 μl 取って、LDH 活性を測定した。

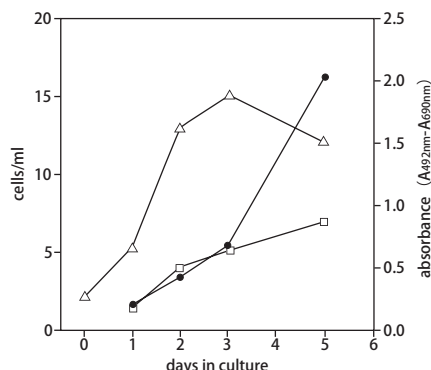
- A. 吸光度値； (○) effector 細胞コントロール
 (●) effector-target 細胞混合液
 (■) (effector-target 細胞混合液) - (effector 細胞コントロール)
- B. 細胞性細胞傷害の割合；「V-5」の計算方法により、決定した。

VI-3. 動物細胞培養における細胞死の測定

- (1) 培養細胞から 12 あるいは 24 時間の一定の間隔でサンプル (0.5 ~ 1 ml) を集める。
- (2) サンプルを遠心して、注意深く培養上清を取る。細胞のない培養上清は酵素活性を失うことなく、4℃で数日間保存が可能である。
- (3) 培養上清を測定培地で 2 倍ずつ段階希釈し、100 μ l ずつ 96 ウェルプレートに加える。
- (4) それぞれのウェルに Solution C を 100 μ l 加えて、室温で 30 分間、静置する。この間、プレートは遮光しておく。
- (5) マイクロプレートリーダーを用いて、490 または 492 nm でサンプルの吸光度を測定する。対照波長は 600 nm 以上とする。

図 6. 細胞培養における細胞死と LDH 放出との相互関係

Ag8 細胞を 2×10^5 cells/ml の濃度で植菌して、37℃、5% CO₂ で培養した。培養後、day 1、2、3、5 で一部をサンプリングした。生存細胞数 (Δ) と死細胞数 (\square) はトリパンブルー排除法により測定し、培養上清の LDH 活性 (\bullet) は本キットにより測定した。



VII. Q & A

Q1：全く発色しない

A1：1. 細胞濃度を調べてください。低すぎるのかもしれません。

2. LDH 活性を阻害する物質が含まれていないか、測定物質や測定培地を調べてください。(物質コントロールI「V-4.」参照)

Q2：低コントロールでも強く発色している

A2：1. 細胞濃度を調べてください。高すぎるのかもしれません。

2. LDH 活性をもつ物質が含まれていないか、測定物質や測定培地を調べてください。(物質コントロールI「V-4.」参照)

3. 自然に放出される LDH 活性が高いのは、測定に用いた細胞の状態が悪いからかもしれません。細胞の状態を調べてください。ある細胞系は短い培養時間でも、無血清培地では生存できません。血清濃度を約 1 ~ 5% に増やしてください。

Q3：強く発色しているのだが、低い吸光度値となってしまうのはなぜ？

A3：バックグラウンドの値を調べてください。自動的に計算している場合、バックグラウンドの値が高いと、結果として測定値はあまりにも低い吸光度値となります。LDH 活性をもつ物質が含まれていないか、測定培地を調べてください。(血清、物質コントロールI「V-4.」参照)

Q4：effector 細胞コントロールが強く発色する

A4：分離方法や培養条件が不適切なため、effector 細胞の状態が悪いと思われます。細胞培養を改良してください。密度勾配法により、死んだ effector 細胞と生きている effector 細胞を分離してください。

VIII. 参考文献

- 1) Cook, J. A. & Mitchell, J. B. *Anal Biochem.* (1989) **179**: 1-7.
- 2) Yuhas, J. M., Toya, R. E. & Pazmino, N. H. *J Natl Cancer Inst.* (1974) **53**: 465-468.
- 3) Parks, D. R. *et al. Proc Natl Acad Sci USA.* (1979) **76**: 1979.
- 4) Jones, K. H. & Senll, J. A. *J Hislochem Cytochem.* (1985) **33**: 77-79.
- 5) Oldham, R. K. *et al. J Natl Cancer Inst.* (1977) **58**: 1061-1067.
- 6) Leibold, W. & Bridge, S. *Z Immunilalsforschung (Immunobiology).* (1979) **155**: 287-311.
- 7) Kolber, M. A. *et al. J Immunol Meth.* (1988) **108**: 255-264.
- 8) Danks, A. M. *et al. Molecular Brain Research.* (1992) **16**: 168-172.
- 9) Szekeres, J., Pacsa, A. S. & Pejlsik, B. *J Immun Meth.* (1981) **40**: 151-154.
- 10) Masanel, J., Gomez-Lechon, M. J. & Castell, J. V. *Toxic in Vitro.* (1988) **2**: 275-282.
- 11) Martin, A. & Clynes, M. *In Vitro Cell Dev.* (1991) **27A**: 183-184.
- 12) Decker, T. & Lohmann-Mallhes, M. L. *J Immun Meth.* (1988) **15**: 61-69.
- 13) Korzeniewski, C. & Callewaert, D. M. *J Immun Meth.* (1983) **64**: 313-320.
- 14) Dubar, V. *et al. Exp Lung Res.* (1993) **19**: 345-359.
- 15) Kondo, T. *et al. Toxic in Vitro* (1993) **7**: 61-67.
- 16) Murphy, E. J., Roberts, E. & Horrocks, L. A. *Neuroscience.* (1993) **55**: 597-605.
- 17) Courjaull, F. *et al. Arch Toxicol.* (1993) **67**: 338-346.
- 18) Shrivaslava, R. *et al. Cell Biology and Toxicology.* (1992) **8**: 157-170.
- 19) Gelderblom, W. C. A. *et al. Fd Chem Toxic.* (1993) **31**: 407-414.
- 20) Thomas, J. P., Geiger, P. G. & Girolli, A. W. *Journal of Lipid Research.* (1993) **34**: 479-490.
- 21) Sasaki, T. *et al. Toxic in Vitro.* (1992) **6**: 451-457.
- 22) Goergen, J. L., Marc, A. & Engasser, J. M. *Cytotechnology.* (1993) **11**: 189-195.
- 23) Legrand, C. *et al. J Biotechnol.* (1992) **25**: 231-243.
- 24) Racher, A. J., Looby, D. & Grilfiths, J. B. *Cytotechnology.* (1990) **3**: 301-307.

IX. 注意

- ・本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社