

Premix WST-1을 이용한 세포 생존능력 측정 Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System에 대한 모든 것

Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System은 세포 증식능력이거나 세포생존 능력을 정량하기 위한 제품으로 세포내의 미토콘드리아 탈수소효소에 의해 Tetrazolium Salts (WST-1)에서 formazan이라는 발색물질이 생성되는 것을 ELISA로 측정한다. 대사적으로 왕성한 활동을 하는 세포의 미토콘드리아 전자전달계에 존재하는 탈수소효소 (Dehydrogenase)인 succinate-tetrazolium Reductase (EC1.3.99.1)에 의한 것으로 살아있는 세포에만 유효하며 곧 발색강도가 세포수와 직선 상관관계를 나타낸다.

본 고에서는 premix 형태로 사용이 매우 간편한 Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System (TaKaRa Code MK400)에 대한 적용방법과 적용예에 대해 소개하고자 한다.

■ 제품구성 (2,500회)

PreMix WST-1	25 ml x 1 bottle
--------------	------------------

*세포 100 µl/well당 10 µl의 premix WST-1을 첨가

**100 µl/well로 배양하는 경우 약 2,500회

***PreMix WST-1은 WST-1과 electron coupling 시약을 멸균된 Phosphate buffered saline (PBS)으로 희석하여 바로 사용할 수 있는 형태이다.

■ 사용방법

1. Microtiterplate에 최종 배양액이 100 µl/well 되도록 세포를 배양한다.*

* 배양 시간이나 배양 세포농도는 각 실험 조건이나 이용하고 있는 세포타입에 따른다. 대부분의 실험에서의 세포농도는 0.1~5×10⁴ 개/well, 배양 시간은 24~96 시간이 적당하다.

2. 세포배양이 끝난 후, Premix WST-1을 1 well 당 10 µl씩 더한다.

3. 1번과 같은 배양조건으로 0.5~4 시간 반응한다.

4. ELISA reader를 이용하여 background 컨트롤*에 대한 샘플의 흡광도를 측정한다. Formazan 산물의 흡광도를 측정하기 위한 파장은 ELISA리더의 필터에 따라 420~480 nm 사이이며(최대파장은 약 440 nm)(그림 2), 대조 파장은 600 nm 이상이 좋다.

*Background 컨트롤 : 1번에서 사용한 배양배지 100 µl과 Premix WST-1을 10 µl 섞어, 이것을 ELISA reader의 background 컨트롤(세포가 없는 배양배지+Premix WST-1의 흡광도)로서 이용한다. 세포가 없는 배양배지에 Premix WST-1을 더한

경우에도 배지, 인큐베이션(incubation) 시간, 빛에 노출 때문에 미약한 흡광도가 측정될 수 있다. 2 시간 후의 일반적인 background 흡광도는 0.1~0.2 사이이다.

【배양조건 설정】

Premix WST-1 첨가 후의 반응(incubation) 시간은 각 실험(세포의 종류나 농도)에 따라 다르므로 Premix WST-1을 첨가 후, 다양한 반응시간 (예를 들면, 0.5, 1, 2, 4시간)에서 흡광도를 반복 측정하여 최적 반응시간을 결정한다. 높은 감도를 원하는 경우 Premix WST-1 존재 하에서 세포를 보다 오랜 시간 반응하면 된다.

■ Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System에 대해서

【제품원리】

세포내 탈수소효소에 의해 WST-1이 formazan 색소로 변환되어 발색강도가 증가한다.

■ 실험예 1 : 마우스 T 세포주 CTLL-2의 Interleukin 2 (IL-2) 활성 측정

【시약】

배양배지

- 10 % heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine, 1 mM Na-pyruvate, 1× 비필수 아미노산, 50 mM 2-mercaptoethanol 포함한 RPMI 1640 (필요에 따라 페니실린, 스트렙토마이신, 젠타마이신을 첨가)
- 인간 IL-2 (10,000 U/ml, 5 µg/ml, 무균상태)
- Premix WST-1

【방법】

1. Microtiter plate에 다양한 농도의 IL-2 (예를 들면, 0.005-25 ng/ml)을 포함하는 배양배지를 100 µl씩 분주하고, CTLL-2 세포를 4×10³ cells/well의 농도로 seeding 한다.
2. 37°C, 5% CO₂로 48시간 동안 세포를 배양한다.
3. Premix WST-1을 well당 10 µl씩 첨가해, 37°C, 5% CO₂로 4 시간 배양 한다.
4. 흡광도를 측정한다.

■ 실험예 2 : WEHI-164 세포에 대한 인간 TNF-α의 세포 독성 측정

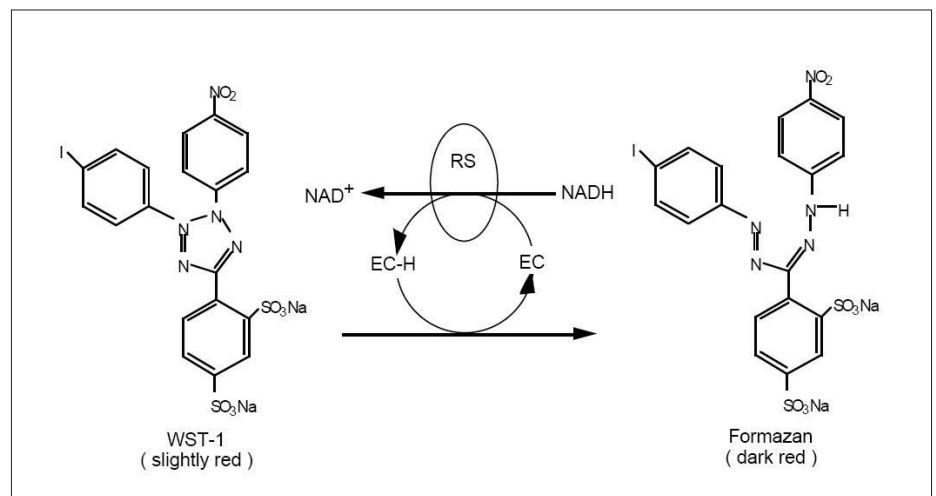


그림 1. Tetrazolium salt (WST-1)이 formazan으로 변환 (EC=electron coupling reagent, RS=mitochondrial succinate-tetrazolium-reductase system)

continued...

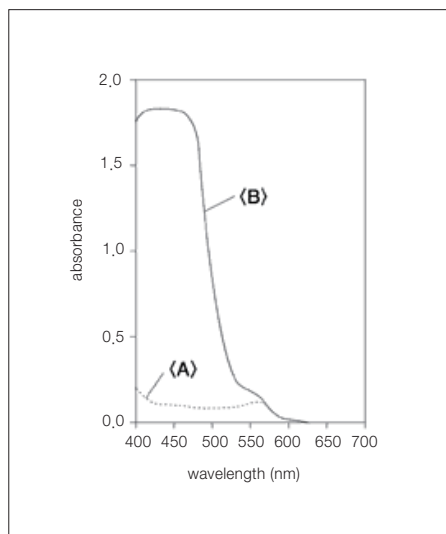


그림 2. Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System의 흡수 곡선 (A)과 미토콘드리아 탈수소효소활성에 의한 분해산물(formazan)의 흡수 곡선 (B). Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System은 10% FCS를 포함하는 RPMI1640 (BioWittaker사)의 세포현탁액과 1:10로 희석하였다.

【결과】

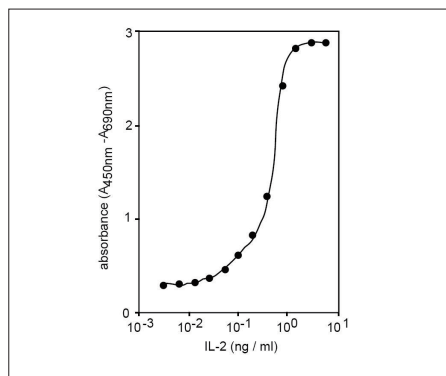


그림 3. 인간 IL-2의 존재하에 CTLL-2 세포의 세포 생존능력 측정결과

【시약】

배양배지

- 10 % heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine, 1 µg/ml actinomycin D 를 포함한 RPMI 1640 (필요에 따라 페니실린, 스트렙토마이신, 젠타마이신을 첨가)
- 인간 TNF-α (10 µg/ml, 무균상태)
- Premix WST-1

【방법】

1. 1 µg/ml actinomycin C1을 포함한 배양배지에 1 x 10⁶ cells/ml의 WEHI-164 세포를 37°C, 5 % CO₂ 3시간동안 배양한다.
2. Actinomycin C1 (1µg/ml)을 포함한 배양배지 100 µl에 5 x 10⁴ cells/well의 농도로 세포를 접종하고, TNF-α (0.001-0.5 ng/ml)를 농도별로 처리한다.
3. 37°C, 5 % CO₂ 에서 24시간 동안 세포를 배양한다.
3. Premix WST-1을 well당 10 µl씩 더해, 37°C, 5 % CO₂로 4시간, 인큐베이션한다.
4. 흡광도를 측정한다.

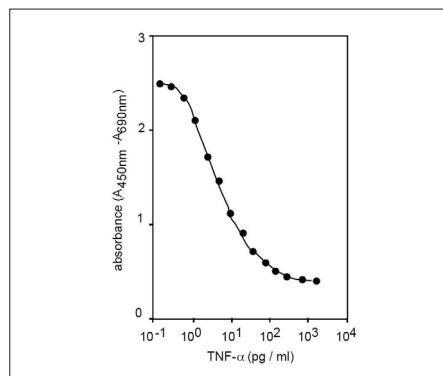


그림 4. WEHI-164세포에 대한 인간 TNF-α 의 세포독성 측정결과

■ Q & A

Q1: 세포증식 측정에 MTT, XTT, MTS라고 하는 시약(tetrazolium salt)이 사용되는데 다카라의 Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System의 차이가 무엇인가요?

A1: 기본적인 원리는 같지만, 각 tetrazolium salt에 의해 생성된 formazan 색소의 물에 대한 용해성이 전혀 다릅니다. MTT는 물에 녹지 않는 formazan 색소의 크리스탈을 형성하므로, 계면활성제나 유기용제로 가용화하는 번거로운 과정이 필요합니다. 또, XTT와 MTS는 수용성의 formazan 색소를 생성하지만 Premix WST-1에 비해 용해성은 낮습니다. 따라서 다른 tetrazolium salt에 비해 WST-1이 감도가 높고, 측정 범위가 넓은 장점을 가집니다.

Q2: 세포를 접종하고 난 뒤, Premix WST-1을 첨가할 때까지 전배양 시간은 어느 정도 필요한가요?

A2: 세포의 종류와 상태(증식기, 정지기 등), 그리고 실험 목적에 따라 다르지만, 일반적으로 overnight 배양(16 hr)으로 충분하다고 생각합니다.

Q3: Formazan 색소의 발색을 측정하는 plate reader의 파장은?

A3: 420~480 nm 사이가 적당합니다. 단, 최대 흡광도는 약 440 nm이므로, 그 범위를 벗어나면 흡광도 값이 저하됩니다.

■ 관련제품

제품명	용량	TaKaRa Code
LDH Cytotoxicity Detection Kit	2000 tests	MK401
in situ Apoptosis Detection Kit	20 회	MK500
PBS (Phosphate Buffered Saline) Tablets	200정	T900