

Immunservice

WST-1
CTLL-2 Proliferations-Kit
(ready-to-use)

Optimiert für Anwendungen mit CTLL-2 Zellen

GEBRAUCHSANWEISUNG

A large, semi-transparent version of the immunservice logo, centered at the bottom of the page. It consists of a large grey circle with the word "immun" in white and "service" in grey, both in a sans-serif font.

1. Einleitung
2. Kurzübersicht
3. Kit-Bestandteile und Lagerungsbedingungen
4. Arbeitsprotokoll
5. Bestellinformationen
6. Weitere Produkte
7. Referenzen

1. Einleitung

Die Bestimmung der Zellproliferation und Zellviabilität hat sich in vielen Bereichen der Biowissenschaft zu einer Schlüsseltechnologie entwickelt. Das Immunservice WST-1 CTLL-2 Proliferations-Kit ermöglicht Ihnen eine einfache, schnelle und präzise Bestimmung der Zellproliferation, der Zellviabilität und Zytotoxizität.

Das CTLL-2-Proliferations-Kit wurde speziell für Anwendungen mit CTLL-2 Zellen optimiert. Bei CTLL-2 Zellen handelt es sich um eine zytotoxische T-Zelllinie, die gut geeignet ist und häufig für die hochsensitive Bestimmung der biologischen Aktivität des Zytokins Interleukin-2 (IL-2), sowie der Zytokine IL-4, IL-12 und IL-18 eingesetzt wird.

Der Assay bietet besonderen Anwendungskomfort und ermöglicht eine nicht-radioaktive, spektrophotometrische Quantifizierung der Proben in 96-Well Mikrotiterplatten.

Das Produkt ist u.a. für folgende Anwendungsbereiche geeignet:

- Messung der CTLL-2 Zellproliferation.
- Bestimmung der biologischen Aktivität von humanem und murinem IL-2 und IL-4, sowie von murinem IL-12 und IL-18 über die Quantifizierung der CTLL-2 Zellproliferation.
- Auswirkung von zytotoxischen/zytostatischen Substanzen (Arzneimittel, andere pharmazeutische Agenzien).
- Checkpoint Inhibitoren Effekte.
- Screening und spezifischer Nachweis von Zellwachstumsinhibitoren, z.B. Antikörper, physiologische Botenstoffe, virus- und tumorinduzierte Immunsuppression.

Nachweisprinzip:

Die Quantifizierung der Zellproliferation basiert auf der Spaltung des wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes WST-1 in einen Formazan-Farbstoff durch zelluläre mitochondriale Dehydrogenasen. Diese Enzyme sind ausschließlich in lebenden Zellen aktiv. Eine Erhöhung der Zellzahl führt zu einer erhöhten Aktivität der Dehydrogenasen und damit gleichzeitig zur Bildung von größeren Mengen des Formazan-Farbstoffes.

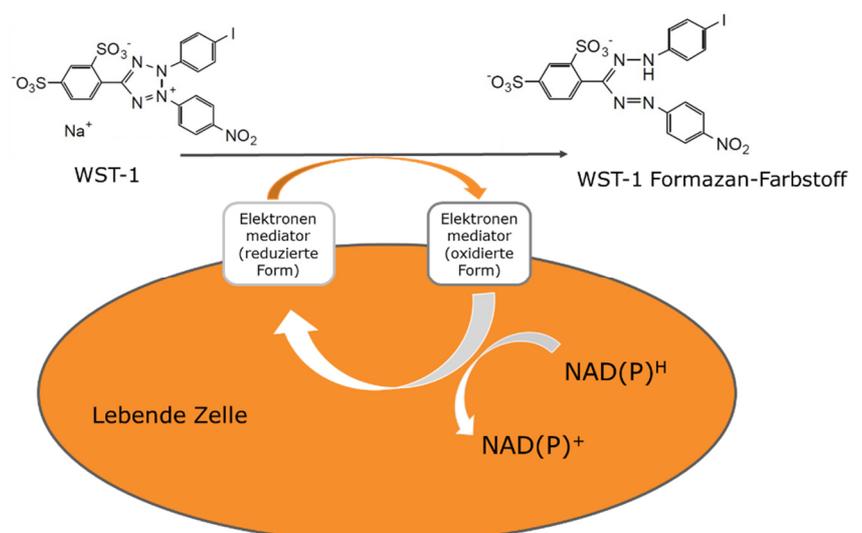


Abbildung 1: Spaltung des Tetrazoliumsalzes WST-1 zum WST-1 Formazan-Farbstoff durch lebende Zellen.

Gebrauchsanweisung

WST-1 CTLL-2 Proliferations-Kit (ready-to-use)
- optimiert für Anwendungen mit CTLL-2 Zellen
Artikelnummer: WST1.CTLL150813.1/.2/.3

Die Menge des dunkelgelben Farbstoffes kann durch die Messung der Absorption bei 420 - 480 nm quantifiziert werden. Die Höhe der Absorption korreliert dabei stark mit der Anzahl der metabolisch aktiven, lebenden Zellen im Assay.

2. Kurzübersicht

Kurzprotokoll:

5 einfache Schritte zum Erfolg Ihrer Zellproliferationsexperimente:

1. Kultivierung von CTLL-2 Zellen in einer Mikrotiterplatte
2. Hinzufügen des WST-1 Reagenz aus dem CTLL-2 Proliferations-Kit
3. Inkubation für 1-4 Stunden
4. Messung der Absorption bei 420 – 480 nm
5. Analyse der Daten

Die Vorteile auf einen Blick:

- | | |
|---------------------|---|
| Einfache Handhabung | <ul style="list-style-type: none">○ Immunservice's WST-1 CTLL-2 Kit ist gebrauchsfertig und enthält leicht verständliche Arbeitsschritte○ Gesamter Assay kann in einer einzigen Mikrotiterplatte durchgeführt werden○ Kein Waschen, Ernten oder Solubilisieren von Zellen notwendig |
| Sicher | <ul style="list-style-type: none">○ Nicht-radioaktiv |
| Präzise & Sensitiv | <ul style="list-style-type: none">○ Absorption korreliert stark mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen |
| Schnell | <ul style="list-style-type: none">○ Schnelle Farbentwicklung○ Kurze Inkubationszeit○ Bearbeitung von einer großen Anzahl an Proben zur gleichen Zeit möglich |
| Kostengünstig | <ul style="list-style-type: none">○ Unsere Preisgestaltung ist darauf ausgelegt, Sie mit dem günstigsten WST-1 Kit auf dem Markt zu versorgen. Zusätzlich erhalten Sie nur bei uns ein Kit, das speziell für CTLL-2 Zellen optimiert wurde. |
| Stabil | <ul style="list-style-type: none">○ Das Immunservice WST-1 Kit ist für mind. 6 Monate bei -20°C stabil. |

3. Kit-Bestandteile und Lagerungsbedingungen

| Art.-Nr. | Bestandteile und Menge | Lagerung |
|-------------------|--|----------|
| WST1.CTLL150813.1 | WST-1 und Elektronenmediator in einer Pufferlösung 10 ml (ausreichend für 1000 Assays) | -20°C |
| WST1.CTLL150813.2 | WST-1 und Elektronenmediator in einer Pufferlösung 25 ml (ausreichend für 2500 Assays) | -20°C |
| WST1.CTLL150813.3 | WST-1 und Elektronenmediator in einer Pufferlösung 4 x 25 ml (ausreichend für 10000 Assays) | -20°C |

Das WST-1 CTLL-2 Proliferations-Kit (ready-to-use) enthält eine klare, rote Flüssigkeit. Es wird empfohlen die Flüssigkeit bei -20°C und vor Licht geschützt zu lagern. Zur Vermeidung von wiederholtem Einfrieren und Auftauen, sollte die Lösung aliquotiert werden. 1 ml Aliquots sind für eine komplette 96-Well Mikrotiterplatte ausreichend. Bei entsprechender Lagerung ist die Stabilität des WST-1-Kits für 6 Monate gewährleistet.

Es kann zu Ausfällungen und Trübung der Flüssigkeit kommen, besonders wenn diese bei +2-+8°C gelagert wird. Falls dies auftreten sollte, erwärmen Sie die Lösung für einige Minuten auf 37°C. Bis zur Auflösung sanft schütteln.

Zusätzlich benötigtes Material:

- Übliche Laborausstattung (Inkubator, Zentrifuge, Pipetten und Pipettenaufsätze, etc.)
- 96-Well Mikrotiter Spektralphotometer (ELISA Plattenleser) mit Filtern zur Messung der Wellenlänge zwischen 420 – 480 nm und > 600 nm.
- 96-Well Mikrotiterplatte

4. Arbeitsprotokoll

Hinweise zur Durchführung des Assays:

Anwendungskonzentration des WST-1 Zellproliferations-Kits:

Pipettieren Sie 10 µl/Well des WST-1 Reagenz aus dem WST-1 CTLL-2 Proliferations-Kit auf CTLL-2 Zellen, die in 100 µl Kulturmedium kultiviert werden. Sollten Sie ein anderes Kultivierungsvolumen verwenden, passen sie die Menge des WST-1 Kits bitte entsprechend an. Zu 200 µl Kulturmedium fügen Sie bspw. 20 µl WST-1 hinzu.

Inkubationszeit

Die Inkubationszeit ist vom individuellen Versuchsaufbau abhängig. Um die optimale Inkubationszeit zu bestimmen, empfehlen wir die Durchführung eines vorläufigen Experimentes unter Berücksichtigung des speziellen Versuchsaufbaus. Zu diesem Zweck können die Mikrotiterplatten an unterschiedlichen Zeitpunkten (z.B. nach 1, 2, 3, 4 h) ausgelesen werden. Anschließend werden die Mikrotiterplatten für eine weitere Farbentwicklung im Inkubator weiter inkubiert und am nächsten Zeitpunkt erneut gemessen.

Für das Erreichen von sehr hoher Sensitivität, können u.U. längere Inkubationszeiten notwendig sein.

Kontrollen

Blank-Kontrolle (Hintergrundkontrolle):

Wir empfehlen die Verwendung einer Blank Kontrolle (Hintergrundkontrolle). Fügen Sie dafür die gleiche Menge Kulturmedium und WST-1, wie in den übrigen Wells, in ein leeres Well (bspw. 100 µl Kulturmedium und 10 µl WST-1). Fügen Sie diesem Well keine Zellen hinzu. Markieren Sie dieses Well als Blank-Position im ihrem Plattenlesegerät.

Anmerkung:

Die Absorptionshöhe der Hintergrundkontrolle ist vom Kulturmedium, der Inkubationszeit und von eventueller Lichteinstrahlung abhängig. Die typische Höhe der Blank-Absorption nach 2 Stunden beträgt etwa 0,1-0,2 Absorptionseinheiten.

Negativ- und Positiv-Kontrollen:

Je nach spezifischen Experiment, empfiehlt sich die Verwendung von geeigneten positiven und negativen Kontroll-Wells.

Zellproliferations-Protokoll:

Gebrauchsanweisung

WST-1 CTLL-2 Proliferations-Kit (ready-to-use)

- optimiert für Anwendungen mit CTLL-2 Zellen

Artikelnummer: WST1.CTLL150813.1/.2/.3

7/12

www.immunservice.com

1. Kultivierung von 4×10^3 CTLL-2 Zellen/Well in einer 96-Well Mikrotiterplatte (Gewebekultur geeignet, flachgrundig) in einem Gesamtvolumen von 100 μ l/Well Kulturmedium unter üblichen Kultivierungsbedingungen (37°C, 5% CO₂, befeuchtete Atmosphäre).

Anmerkung:

Eine Zellkonzentration von 4×10^3 Zellen/Well ist für die meisten Experimente geeignet. Für Toxizitätsassays, kann die Verwendung einer höheren Zellzahl notwendig sein (bspw. 5×10^4 – 5×10^5 Zellen/Well).

2. Inkubation der Zellen für 24-96 Stunden.

Anmerkung:

Bestimmen Sie die optimale Inkubationszeit für Ihr spezifisches Experiment in einem Vorversuch.

3. Zugabe von 10 μ l des WST-1 Reagenz aus dem CTLL-2 Proliferations-Kit.

Anmerkung:

Sollten Sie ein anderes Kultivierungsvolumen verwenden als 100 μ l, passen Sie die Menge des WST-1 Reagenz bitte entsprechend an (z.B. 20 μ l WST-1 auf 200 μ l Kulturmedium).

4. Inkubation der Mikrotiterplatte für 1-4 Stunden unter den üblichen Kultivierungsbedingungen (37°C, 5% CO₂, befeuchtete Atmosphäre).

Anmerkung:

Bestimmen Sie die optimale Inkubationszeit für Ihr spezifisches Experiment in einem Vorversuch.

5. Mischen der Mikrotiterplatte für etwa 1 min auf einem Schüttler.

6. Messung der Absorption des gebildeten Formazan-Farbstoffes gegen die Blank-Kontrolle mit Hilfe eines Spektralphotometers. Eine Wellenlänge zwischen 420-480 nm ist geeignet um den Farbstoff zu detektieren. Die optimale Absorption des Farbstoffes liegt bei 440 nm. Bei Verwendung einer Referenzwellenlänge sollte diese über 600 nm liegen.

Anmerkungen zum Assay:

1. Die Proben sollten immer in Duplikaten oder Triplikaten gemessen werden, um eine möglichst hohe Genauigkeit der Messergebnisse zu gewährleisten.

2. Der Assay kann durch die Zugabe von 10 μ l Natriumlaurylsulfat (SDS) gestoppt werden.

3. Kulturmedien, die Phenolrot enthalten, können uneingeschränkt für den Assay eingesetzt werden. Es erfolgt keine signifikante Beeinträchtigung durch den Farbstoff beim Auslesen.

5. Bestellinformationen

Gebrauchsanweisung

WST-1 CTLL-2 Proliferations-Kit (ready-to-use)

- optimiert für Anwendungen mit CTLL-2 Zellen

Artikelnummer: WST1.CTLL150813.1/.2/.3

8/12

www.immunservice.com

Bestellungen werden über unsere Homepage, per Telefon, Fax oder E-Mail entgegengenommen.

Homepage: <http://www.immunservice.com>

Telefon: +49 (0)40 / 611 35 184

Fax: +49 (0)40 / 380 178 572 79

E-Mail: order@immunservice.com

Falls sie Fragen, Probleme oder Anregungen haben, können Sie sich gern jederzeit mit uns in Verbindung setzen.

6. Weitere Produkte

- | | |
|--|---|
| 1. WST-1 Zellproliferations-Kit (ready-to-use) | Best.-Nr. WST1.150813.1 Best.-Nr. WST1.150813.2 Best.-Nr. WST1.150813.3 |
| 2. i2Cult IL-2 Komplettmedium - für die Kultivierung IL-2-abhängiger Zellen | Best.-Nr. IL2.130411.4 |
| 3. i2Cult - CTLL-2 Komplettmedium | Best.-Nr. IL2.130411.5 |
| 4. Rekombinantes Humanes Interleukin-2 | Best.-Nr. IL2.130411.1 Best.-Nr. IL2.130411.2 Best.-Nr. IL2.130411.3 |

Für eine vollständige Übersicht weiterer Produkte und Gebrauchsanweisungen, besuchen und speichern Sie bitte unsere Homepage <http://www.immunservice.com>.

7. Referenzen

1. Berridge, M. V., Herst, P. M. & Tan, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnol. Annu. Rev.* 11, 127–152 (2005)
2. Cook, J. A. & Mitchell, J. B. Viability measurements in mammalian cell systems. *Anal. Biochem.* 179, 1–7 (1989)
3. Davis, L. S., Lipsky, P. E. & Bottomly, K. Measurement of human and murine interleukin 2 and interleukin 4. *Curr. Protoc. Immunol.* Chapter 6, Unit 6.3 (2001)
4. Heiden, M. G. Vander et al. The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. 324, 1029–1034 (2009).
5. Khatri A1, Husaini Y, R. P. Murine CTLL-2 cells respond to mIL12: prospects for developing an alternative bioassay for measurement of murine cytokines IL12 and IL18. *J. Immunol. Methods* 326, 41–53 (2007)
6. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63 (1983).

Für weitere Referenzen kontaktieren Sie bitte Research@immunservice.com



www.immunservice.com

Falls Fragen auftreten, zögern Sie bitte nicht sich mit uns in Verbindung zu setzen: support@immunservice.com

Immunservice GmbH
Christoph-Probst-Weg 4
20251 Hamburg, Deutschland
Tel.: +49 (0)40 / 611 35 184
Fax: +49 (0)40 / 380 178 572 79

Dieses Produkt dient nur zu Forschungszwecken. Es ist nicht für den Einsatz in diagnostischen oder therapeutischen Verfahren gedacht. Verwenden Sie dieses Produkt nicht als Nahrungsmittel, als Kosmetik- oder Hausmittel. Die Produkte der Immunservice GmbH dürfen nicht weiterverkauft oder übertragen, für den Verkauf oder die Übertragung verändert werden, oder zur Herstellung kommerzieller Produkte verwendet werden, ohne eine schriftliche Genehmigung der Immunservice GmbH.

Copyright © 2015 Immunservice GmbH. Alle Rechte vorbehalten.
Die Informationen sind zum Zeitpunkt der Erstellung, nach bestem Gewissen, korrekt.

Gebrauchsanweisung
WST-1 CTLL-2 Proliferations-Kit (ready-to-use)
- optimiert für Anwendungen mit CTLL-2 Zellen
Artikelnummer: WST1.CTLL150813.1/.2/.3

12/12
www.immunservice.com