

EZ4U

NONRADIOACTIVE CELL PROLIFERATION AND CYTOTOXICITY ASSAY.
CAT. NO. BI-5000 10 X 96 DETERMINATIONS

NICHTRADIOAKTIVER
ZELLPROLIFERATIONS- UND ZYTOTOXIZITÄTSTEST
KAT. NR. BI-5000 10 X 96 BESTIMMUNGEN

FOR RESEARCH USE ONLY
NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES

rev.no. 160725 (replacing 301004)

Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, A-1210 Wien, Divischgasse 4
Tel. +43/1/291 07 45, Fax +43/1/291 07 85, E-mail export@bmgrp.com



CONTENT / INHALT

- 1) ENGLISH 3
- 2) DEUTSCH ... 7

*Additional information on our products is available on our website.
Zusätzliche Information zu unseren Produkten ist auf unserer Homepage erhältlich.*

www.bmgrp.com

1) INTRODUCTION

Proliferation assays are widely used in cell biology for the study of growth factors, cytokines, nutrients and for the screening of cytotoxic or chemotherapeutic agents. There are several ways to determine the number of cells either by microscopic inspection, or by the use of an electronic particle counter, indirectly by measuring the incorporation of radioactive precursors, quantitating total protein with chromogenic dyes, or by measuring metabolic activity of cellular enzymes. The most common assay for cell proliferation is the incorporation of ^3H -thymidine into cellular DNA. The ^3H -thymidine assay is, however, labour intensive as it requires the removal of excess, unincorporated label by using some method of cell harvesting before measurement. In 1956, the first paper was published on the use of tetrazolium salts as indicators of cell viability. The method was based on the finding that living cells are capable to reduce slightly or uncoloured tetrazolium salts into intensely coloured formazan derivatives. This reduction process requires functional mitochondria, which are inactivated within a few minutes after cell death. This method therefore provides an excellent tool for the discrimination of living and death cells. However, the early tetrazolium salts did have some disadvantages, such as the insolubility of the resulting formazan products. Time and labour consuming resolubilisation procedures were necessary, including repipetting and mixing, or the application of hazardous solubilisers. This necessary post assay treatment, however, irreversibly terminated cell proliferation and thus made it impossible to prolong incubation in order to achieve an increase in sensitivity or continue cell culture. These inconveniences led to the development of non-toxic tetrazolium salts which yield soluble reduction products. Although the assay procedure was made easier by these soluble dyes, in practice the use was limited due to the instability of the formazan dye and a relatively low absorbance of the end product as compared to the classical MTT assay. The BIOMEDICA research department has solved both problems and created an easy to use, rapid and reliable non-isotopic cell proliferation assay. For convenience, we have made it highly compatible with the standard thymidine incorporation assay. Therefore, no changes are required in the setup of the test and in the "labelling" procedure. Furthermore, there is no need for the removal of culture medium before or after the addition of the chromogenic substrate and neither solubilisation nor harvesting procedures are necessary. The work performed by BIOMEDICA resulted in an assay which combines the best of the thymidine and MTT methods, namely: accuracy, speed, reliability and ease of use. Also, according to our data achieved so far, the chromophore appears to be non-toxic. A double labelling with EZ4U and a radioactive nucleotide to obtain more information about cell viability and DNA content is now feasible.

2) CONTENTS OF THE KIT

CONT	KIT COMPONENTS	QUANTITY
SUB	Substrate, lyophilised	10 vials
ACT	Activator solution, ready to use	1 x 30 ml
	Package insert + QC sheet	1 piece each

3) MATERIAL AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

Microtiterplate reader equipped with a 450 nm or 492 nm filter (see Fig. 1). We recommend the use of a 620 nm to 690 nm reference wavelength, which is beneficial but not absolutely necessary.

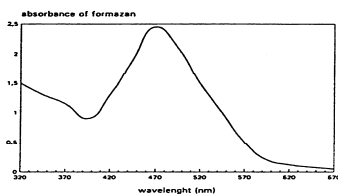


Fig. 1. Absorption spectrum of Formazan.

4) REAGENTS AND SAMPLE PREPARATION

One vial SUB contains the amount of substrate sufficient for one 96 well plate with 200 µl of cell culture medium/well. If more substrate is needed, combine the dissolved substrates prior to pulsing.

Dissolve the SUB (substrate) in 2.5 ml ACT (activator). Prewarm this solution to 37°C prior to addition. If necessary, warm up the substrate vial in your hand while mixing with activator.

This procedure yields a straw-coloured solution.

The mixed substrate is designed for immediate use only and should not be stored.

5) GENERAL CONSIDERATIONS FOR SETTING UP ASSAYS WITH EZ4U

The assay set-up is performed in a manner similar to the standard 3H-thymidine incorporation method. Instead of pulsing with tritiated nucleotide, 20 µl of dye solution is added to 200 µl sample. Incubation time is dependent on the metabolic capacity of the cells. Usually 2 to 5 hours of incubation at 37°C are sufficient to yield a significant increase in colour intensity. As different cells vary in their ability to convert the yellow coloured tetrazolium compound to its red formazan derivative, we recommend testing every new cell-line's metabolic capacity as described in Fig.2. After incubation, the plate is removed from the incubator and gently mixed by tipping the plate at all four sides. To avoid increased standard deviations, the plate must be shaken before reading the optical density.

The absorbance is measured by a microplate-reader, set at 450 nm or 492 nm with 620 nm as a reference. The reference absorbance at 620 nm (or any wavelength between 620-690 nm) is used to correct for nonspecific background values, caused by cell debris, fingerprints, or other potential interferences. However, the reference may be omitted without significant changes in the accuracy of the assay.

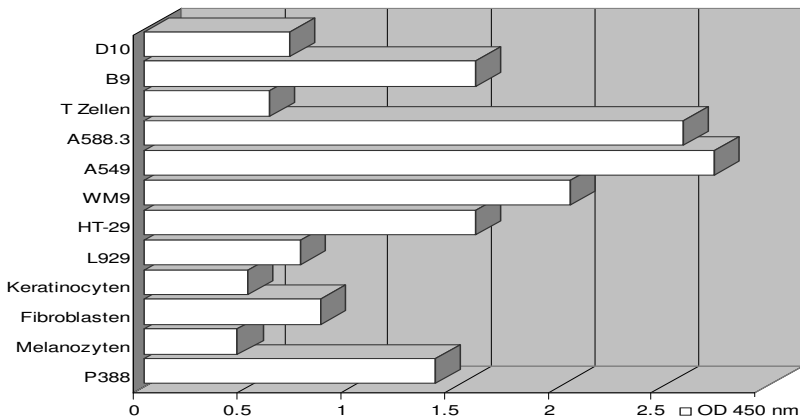


Fig. 2. Different metabolic capacity of various cell lines.

3×10^3 cells/well were cultivated in 200 µl RPMI 1640. Following a cultivation period of 3 days, 25 µl of the dye substrate were added to each well. Optical density was recorded after 4 hours, showing significant differences in the metabolic capacity of the various cell lines.

6) IMPORTANT CONSIDERATIONS

- The substrate is not sterile. If sterile conditions are demanded, the solubilised ready to use dye substrate must be sterile filtered. (A minor turbidity prior filtration interferes neither with the filtration, nor with the assay performance).
- Due to the high sensitivity of this test, it is advisable to use as little cells as possible. Otherwise the occurrence of a non linear titration-curve may be possible.
- To achieve reproducible time kinetics in colour development, equilibrate cell cultures at 37°C.
- Do not prolong incubation times without pretesting, this might result in an increased background without improved sensitivity.
- The use of a reference wavelength of 620 nm (which is subtracted from the values obtained at 450 or 492 nm) is not absolutely necessary, but increases the performance of the test.
- The chromophore appears to be non-toxic and therefore prolongation of cell culture is possible after removal of the formazane derivative.

7) ASSAY PROTOCOL

All reagents and samples must be at room temperature (18-26°C) before use in the assay.

Add 200 µl cell culture into respective wells.

Add 20 µl SUB (substrate) into each well, swirl gently.

Incubate at 37°C for 2-5 hours, depending on the metabolic capacity of the cells.

If no microplate reader with shaking plate carrier is available, mix the plate on a vibrating platform or by tipping with the fingers.

Read absorbance at 450 nm or 492 nm, with 620 nm as reference.

For the most accurate results, absorbance from a substrate blank in assay medium without cells should be subtracted from all other values.

8) TECHNICAL HINTS

- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources.
- Do not mix stoppers and caps from different reagents or use reagents between lots.
- Do not use reagents beyond expiration date.
- Protect reagents from direct sunlight.
- Avoid foaming when mixing reagents.

9) PRECAUTIONS

- Do not pipette by mouth.
- Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics where reagents are used.
- Avoid all contact with the reagents by using gloves.

10) LITERATURE

- Hansen M. B., Nielsen S.E. and Berg K., J. Immunol. Meth. 119, 203-210, (1989)
- Denizot F. and Lang R., J. Immunol. Meth. 89, 271-277, (1986)
- Carmichael J. et al., Cancer Res., 47, 943-946, (1987)
- Karasek M; Gruszka. Et al. Department of Electron Microscopy, J Pineal Res 2003 May;34(4):294-6
- Klockung R. et al; Institute for Antiviral Chemotherapy; Antivir Chem Chemother 2002 13(4):241-9;
- Wutzler P. et al.; Institute for Antiviral Chemotherapy; Antiviral Res 2002 May;54(2):89-97
- Hutter R. et al., Circulation, Apr 2003; 107: 1658-1663.
- Sturlan S. et al., Blood, Jun 2003; 101: 4990-4997.

- Völlenkle Ch. et al., *Appl Envir Microbiol.*, Mar 2004; 70: 1514-1521.
- Bauer S. et al., *J Immunol.*, Mar 2004; 172: 3930-3939.
- Thurow K. et al., *Journal of the Association for Laboratory Automation*, Jun 2004; 9: 159-162.
- Heffeter P. et al., *J Pharmacol Exp Ther.*, Jan 2005; 312: 281-289.
- Kuhl A. et al., *Antimicrob Agents Chemother.*, Mar 2005; 49: 987-995.
- Sulochana KN. et al., *J Biol Chem*, Jul 2005; 280: 27935-27948.
- Ank N. et al., *J. Virol.*, Aug 2005; 79: 9831-9841.
- Wegner B. et al., *Nephrol Dial Transplant.*, Oct 2005; 20: 2071-2079.
- Fineschi S. et al., *FASEB J*, Jan 2006; 10.1096/fj.05-4870fj.
- Perabo F. et al., *Anticancer Res*, May 2006; 26: 2129-2135.
- Bauer S. et al., *J. Immunol.*, Aug 2006; 177: 2423-2430.
- Wolf AM et al., *Haematologica*, Sep 2006; 91: 1165-1171.
- Yoshida A. et al., *Anticancer Res*, Nov 2006; 26: 4003-4007.
- Molnarfi F. et al., *J Immunol.*, Jan 2007; 178: 446-454.
- Demyanets S. et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, Sep 2007; 293: H1962-H1968.
- Tonack S. et al., *Endocrinology*, Dec 2007; 148: 5902-5912.
- Sonvilla G. et al., *Carcinogenesis*, Jan 2008; 29: 15-24.
- Hochegger K. et al., *J Am Soc Nephrol.*, Aug 2008; 19: 1520-1529.
- Stewart-Jones G. et al., *PNAS*, Apr 2009; 106: 5784-5788.
- Walochnik J. et al., *J Antimicrob Chemother.*, Sep 2009; 64: 539-545.
- Stuhlmeier K. et al., *Exp Biol Med.*, Nov 2009; 234: 1327-1338.
- Ang ChW. et al., *Carcinogenesis*, Sep 2010; 31: 1541-1551.
- Shehata M. et al., *Blood*, Oct 2010; 116: 2513-2521.
- Cindric M. et al., *Anticancer Res.*, Oct 2010; 30: 4063-4069.
- Gomez A. et al., *Mol Pharmacol.*, Dec 2010; 78: 1004-1011.
- Breinig M. et al., *Clin Cancer Res.*, Apr 2011; 17: 2237-2249.
- Jungwirth U. et al., *Mol Pharmacol.*, May 2012; 81: 719-728.
- Swoboda A. et al., *Hum Mol Genet.*, Aug 2012; 21: 3387-3396.
- Cao R. et al., *PNAS*, Sep 2012; 109: 15894-15899.

1) EINLEITUNG

Proliferationsteste sind eine häufig verwendete Methode zum Studium von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Nährstoffen, zytotoxischen und chemotherapeutischen Substanzen. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Anzahl der Zellen zu bestimmen:

- direkt durch Auszählen unter dem Mikroskop oder mit Hilfe eines elektronischen Teilchenzählers
- indirekt durch Messung von eingebauter Radioaktivität, Bestimmung des Gesamtproteins mit chromogenen Farbstoffen oder aus der Umsatzrate von zellulären Enzymen.

Die gebräuchlichste Methode bedient sich des Einbaus von 3H-Thymidin in die DNA der Zelle. Für diesen 3H-Thymidintest ist jedoch ein erheblicher Arbeitsaufwand erforderlich, da die Abtrennung des überschüssigen, nicht eingebauten 3H-Thymidins vor der Messung erforderlich ist. 1956 wurde zum ersten Mal eine Publikation über die Verwendung von Tetrazoliumsalzen als Indikator für die Zellvitalität veröffentlicht. Die Methode beruhte auf der Entdeckung, dass von lebenden Zellen farblose oder schwach gefärbte Tetrazoliumsalze in intensiv gefärbte Formazanderivate umgewandelt werden können. Diese Reduktion erfordert intakte Mitochondrien, die innerhalb weniger Minuten nach dem Absterben der Zelle inaktiv werden. Daraus ergibt sich eine ausgezeichnete Unterscheidungsmöglichkeit zwischen lebenden und toten Zellen. Die ursprünglich verwendeten Tetrazoliumsalze hatten aber einige Nachteile, wie zum Beispiel die Unlöslichkeit der gebildeten Formazanderivate. Es waren zeit- und arbeitsaufwendige Schritte oder die Anwendung von Lösungsmitteln notwendig, um diese Verbindungen wieder in Lösung zu bringen. Diese Behandlung beendete irreversibel die Zellproliferation und machte eine Verlängerung der Inkubation zur Erhöhung der Empfindlichkeit oder eine Fortsetzung der Zellkultivierung unmöglich. Eine Weiterentwicklung war die Verwendung von nicht-toxischen Tetrazoliumsalzen, die zu löslichen Reduktionsprodukten umgewandelt werden. Trotz Vereinfachung der Testdurchführung mit diesen löslichen Farbstoffen war die Anwendung durch die Instabilität der Formazanderivate und wegen relativ schwacher Absorptionswerte der Endprodukte im Vergleich zum "klassischen" MTT-Assay beschränkt.

Der BIOMEDICA gelang es, beide Probleme zu lösen und einen einfachen, schnellen, verlässlichen und nichtradioaktiven Zellproliferationstest zu entwickeln. Um die Etablierung für den Anwender zu vereinfachen, wurde dieser Test in hohem Maße dem Thymidin Standardtest angepasst. Es sind daher keine großen Veränderungen nötig, auch nicht bei der "Markierungstechnik". Das Entfernen des Kulturmediums vor und nach der Zugabe des chromogenen Substrats ist ebenso wenig notwendig wie ein Lösungs- oder Zell-Separationsschritt.

Der EZ4U-Test vereint in sich die Vorteile des Thymidintests und der MTT-Methode: Genauigkeit, Schnelligkeit, Zuverlässigkeit und Einfachheit in der Anwendung. Das Chromophor ist, soweit bekannt, nicht toxisch, und eine Doppelmarkierung mit EZ4U und einem radioaktiven Nukleotid, um mehr Information über die Zellvitalität und den DNA-Gehalt zu bekommen, ist daher möglich.

2) INHALT DES KITS

CONT	KIT KOMPONENTEN	MENGE
SUB	Substrat, Lyophilisiert	10 x 96 Teste
ACT	Aktivator, gebrauchsfertig	1 x 30 ml
	Beipacktext + QC Blatt	Je 1 Stück

3) ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL UND GERÄTE

Mikrotiterplatten Photometer mit einem 450 nm oder 492 nm Filter (siehe Fig.1). Vorteilhaft ist die Verwendung einer Referenzwellenlänge bei 620 nm oder 690 nm. Falls nicht vorhanden, kann auch ohne Referenzwellenlänge gemessen werden.

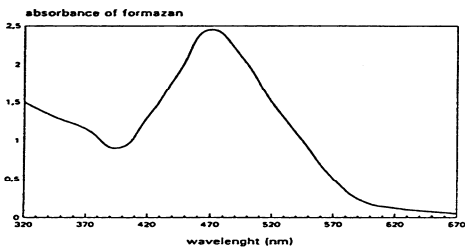


Fig. 1. Absorptionsspektrum von Formazan.

4) REAGENZIEN UND PROBEVORBEREITUNG

Ein Fläschchen SUB beinhaltet die entsprechende Menge Substrat für eine 96 Well Mikrotiterplatte mit 200 µl Zellkulturmedium / Well. Falls mehr SUB notwendig ist, mischen Sie gelöste Substrate vor der Durchführung des Tests.

Lösen Sie 1 Fläschchen SUB (Substrat) in 2,5 ml ACT (Aktivator). Erwärmen Sie die Lösung vor Zugabe auf 37°C. Falls notwendig, erwärmen Sie das Substrat Fläschchen in ihrer Hand, während des Lösens im Aktivator. Die Lösung ist nach Auflösung des SUB strohgelb gefärbt.

Das Substratgemisch ist für den unmittelbaren Gebrauch bestimmt und kann nicht aufbewahrt werden.

5) ALLGEMEINE BEMERKUNGEN ZUR ETABLIERUNG EINES TESTS MIT EZ4U

Nach variabler Kulturdauer (je nach experimentellem Ansatz) werden ähnlich wie bei der 3H-Inkorporationsmethode 20 µl der Farbstofflösung zu 200 µl Zellkultur zugegeben. Die Inkubationszeit ist von der Umsetzungskapazität der Zellen abhängig. Normalerweise sind Inkubationszeiten von 2 bis 5 Stunden bei 37°C für einen signifikanten Intensitätsanstieg der Farbe ausreichend. Da Zellen eine unterschiedliche Fähigkeit zur Umsetzung der zart gelb gefärbten Tetrazolium-Verbindung in das ziegelrote Formazanderivat haben, ist es empfehlenswert, jede neue Zelllinie auf ihre Umsetzungskapazität auszutesten (Abb. 2). Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Platte aus dem Inkubator genommen und durch sanftes Antippen an allen vier Seiten gemischt. Anschließend wird die Absorption im Mikrotiterplatten-Photometer bei 450 nm oder 492 nm (mit 620 nm als Referenzwellenlänge) gemessen. Die Messung der Absorption bei 620 nm (bzw. 690 nm) dient zum Abzug des Leerwerts, der von Zellbruchstücken, Fingerabdrücken oder anderen Störfaktoren herrühren kann. Dieser Referenzabzug kann aber auch ohne signifikanten Verlust an Empfindlichkeit unterbleiben.

3x10³ Zellen/Well wurden 3 Tage in 200 µl RPMI1640 kultiviert. Nach Zugabe von 25 µl Farbstofflösung und weiterer Inkubation für 4 Stunden zeigte die Absorption bei 450 nm signifikante Unterschiede in der metabolischen Aktivität der verschiedenen Zellen.

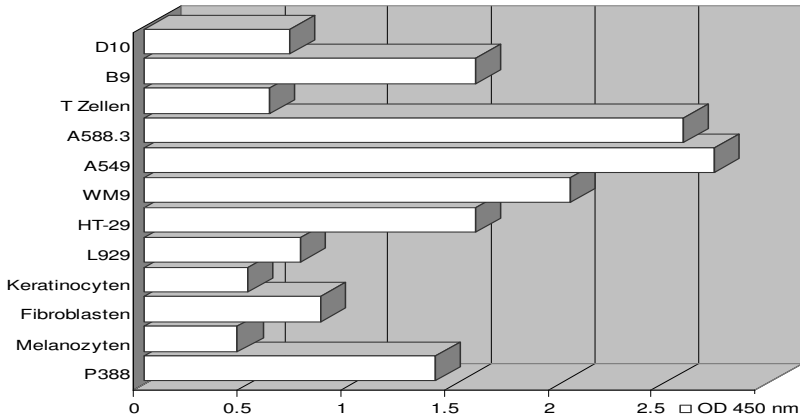


Abb. 2. Metabolische Kapazitäten verschiedener Zelllinien.

6) WICHTIGE BEMERKUNGEN

- Das Substrat ist nicht steril. Wenn keimfreie Bedingungen gewünscht werden, kann das fertige Substrat ohne Bedenken steriltfiltriert werden (eine leichte Trübung nach dem Lösen stört weder die Filtration noch den Test).
- Da dieser Test sehr empfindlich ist, sollten möglichst wenig Zellen verwendet werden. Es könnte sonst zu einer nichtlinearen Titrationskurve kommen.
- Um eine gleichbleibende Zeitkinetik in der Substratumwandlung zu erreichen, sollen die zu evaluierenden Zellkulturen bei 37°C äquilibriert werden.
- Die Inkubationszeit sollte ohne vorheriges Austesten nicht verlängert werden, da eine Verlängerung zu einem Leerwertanstieg ohne Verbesserung der Empfindlichkeit führen kann.
- Die Verwendung einer Referenzwellenlänge von 620 nm, deren Absorptionswert von dem gemessenen Wert bei 450 nm (492 nm) abgezogen wird, ist nicht unbedingt erforderlich, verbessert aber die Testgenauigkeit.
- Da das Chromophor soweit bekannt nicht toxisch ist, ist eine Weiterführung der Zellkultur nach Wegwaschen des Formazanderivates möglich.

7) TESTPROTOKOLL

Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen.

Pipettieren Sie 200 µl Zellkultur in die vorgesehenen Wells.

Pipettieren Sie 20 µl SUB (Substrat) in alle Wells, gut mischen.

Für 2 - 5 Stunden bei 37°C inkubieren, abhängig von der Stoffwechselkapazität der Zellen.

Die Platte mit der Schüttleinrichtung eines Mikrotiterplatten-Photometer, einem entsprechenden Schüttelgerät oder durch Antippen mit dem Finger mischen.

Extinktion bei 450 nm oder 492 nm messen, mit 620 nm als Referenz, falls möglich.

Es wird empfohlen, einen Leerwert (Substrat ohne Zellen) von den Messwerten abzuziehen.

8) TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien von verschiedenen Lots oder Testen dürfen nicht gemischt werden.
- Stöpsel oder Verschlüsse von verschiedenen Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Abgelaufene Reagenzien dürfen nicht verwendet werden.
- Reagenzien sind vor direktem Sonnenlicht zu schützen.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.

9) VORSICHTSMASSNAHMEN.

- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Nicht Rauchen, Essen, Trinken oder Kosmetika benutzen während der Verwendung der Testreagenzien.
- Verwenden Sie Handschuhe zur Vermeidung den Kontakt mit Reagenzien.

10) LITERATUR

Siehe Kapitel 10) LITERATURE im englischen Teil des Beipacktextes.

SYMBOLS



Expiry date / Verfallsdatum / Date de péremption / Data di scadenza / Fecha de caducidad / Data de validade / Uiterste gebruiksdatum / Udløbsdato / Utgångsdatum / Termin Ważności / Lejárati idő / Doba expirácie / Doba expirace



Consider instructions for use / Bitte Gebrauchsanweisung beachten / Consultez la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las instrucciones de utilización / Consulte as instruções de utilização / Raadpleeg de gebruiksaanwijzing / Se brugsanvisningen / Läs anvisningarna före användning / Proszę przeczytać instrukcję wykonania / Vegyűk figyelembe a használati utasításban foglaltakat / Postupujte podľa pokynov na použitie / Postupujte dle návodu k použití



In vitro Diagnostic Medical Device (for in Vitro Diagnostic Use) / In vitro Diagnostikum (zur In-vitro-Diagnostik) / Dispositif médical de diagnostic in vitro (Pour usage diagnostique in vitro) / Dispositivo medico per diagnostica in vitro (per uso diagnostico in vitro) / Dispositivo médico de diagnóstico in vitro (para uso diagnóstico in vitro) / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro (Para utilização de diagnóstico "in vitro") / Medisch hulpmiddel voor diagnostiek in vitro (Voor diagnostisch gebruik in vitro) / Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik (Udelukkende til in vitro diagnostisk anvendelse) / Medicinteknisk produkt avsedd för in vitro-diagnostik (För in vitro-diagnostiskt bruk) / Wyrób medyczny do Diagnostyki In Vitro / In vitro orvosi diagnosztikai termék / In vitro diagnostický zdravotnícký materiál (určené pre diagnostiku „in vitro“) / In vitro diagnostický zdravotnícký materiál (určeno pro diagnostiku „in vitro“)



Lot-Batch Number / Charge-Chargennummer / Lot-Code du lot / Lotto-Número di lotto / Lote-Código de lote / Lote-Código do lote / Lot-Partijnummer / Lot-Batchkode / Lot-Satskod / Numer serii / Lot-Batch szám / Číslo šarže / Číslo šarže



Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por / Fabricado por / Vervaardigd door / Fabrikation af / Tillverkad av / Wyprodukowane pr / Gyártotta / Vyrobené / Vyrobeno



Catalogue Number / Bestellnummer / Numéro de référence / Numero di riferimento / Número de referencia / Número de referência / Referentienummer / Referencenummer / Katalognummer / Numer katalogowy / Katalógusszám / Katalógové číslo / Katalogové číslo



Store at between / Lagerung bei zwischen / Conserver à entre / Conservare a tra / Conservar a temp. entre / Armazene a entre / Bewaar bij tussen / Opbevares mellem / Förvaras vid / Przechowywać w / Tároljuk között / Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezi



Contains sufficient for x tests / Inhalt ausreichend für x Tests / Contient suffisant pour x tests / Contenido suficiente per x test / Contiene suficiente para x pruebas / Contém suficiente para x testes / Bevat voldoende voor x bepalingen / Ineholder tilstrækkeligt til x prøver / Innehållet räcker till x analyser / Zawartość na x testów / Tartalma X teszt elvégzésére elegendő / Obsahuje materiál pre x testov / Obsahuje materiál pro x testů

