

PRODUKT INFORMATION

XTT Cell Proliferation Assay

Kat.-Nr. 39904

Einführung

Der XTT Cell Proliferation Assay Kit ist ein kolorimetrischer Test, der die zellulären Stoffwechselaktivitäten nachweist. Während des Tests wird das gelbe Tetrazolium-salz XTT (Natrium-2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium) durch Dehydrogenase-Enzyme in metabolisch aktiven Zellen zu einem stark gefärbt Formazan-Farbstoff reduziert.

Diese Umwandlung tritt nur in lebensfähigen Zellen auf, und somit ist die Menge an erzeugtem Formazan proportional zu lebensfähigen Zellen in der Probe. Der im Test gebildete Formazan-Farbstoff ist in wässriger Lösung löslich und kann durch Messen der Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm unter Verwendung eines Spektralphotometers quantifiziert werden.

Ein Elektronenkupplungsreagens wie PMS (N-Methylphenazoniummethylsulfat) kann die Effizienz der XTT-Reduktion in Zellen signifikant verbessern.

Vorteile / Eigenschaften

- Einfach zu verwenden: Es sind keine zusätzlichen Reagenzien und / oder Waschvorgänge erforderlich.
 - Schnell: Durchführung innerhalb von 2 - 5 Stunden (kein Solubilisierungsschritt wie in einem MTT-Assay)
 - Sensitivität: Kann auch in niedrigen Zellkonzentrationen getestet werden.
 - Genauigkeit: Die Farbstoffabsorption ist proportional zur Anzahl der Zellen in jeder Vertiefung.
 - Keine Radioaktivität
 - Ideal für Assays mit hohem Durchsatz, kein Waschen oder andere Schritte, die Zellverlust und -variabilität verursachen können
 - Der gesamte Assay kann direkt in einer Mikrotiterplatte durchgeführt werden.
-

Lagerung

Nach Erhalt Lagerung bei -15 °C bis -25 °C.

Die XTT-Lösung muss lichtgeschützt gelagert werden.

XTT-Arbeitslösung

Unmittelbar vor dem Gebrauch 100 µl des Aktivierungsreagens zu 5 ml XTT-Reagenz hinzufügen, um die XTT-Arbeitslösung herzustellen.

Die XTT- Arbeitslösung sollte innerhalb weniger Minuten zu den Zellen hinzugefügt werden.

Ist in der XTT-Lösung ein Sediment vorhanden, die Lösung auf 37 °C erhitzen und vorsichtig mischen bis die Lösung klar ist.

Assayprotokoll

1. Zellen in 96-well-Platte mit einer Zelldicht von 10^4 - 10^5 Zellen/well mit bis zu 10 % (v/v) Serum im Kulturmedium ausplattieren.
2. Anschließend können die Zellen entsprechend behandelt/stimuliert werden.
3. 24 - 48 Stunden Kultivierung der Zellen in einem CO₂-Inkubator bei 37 °C.
4. Zugabe von 50 µl/well XTT-Arbeitslösung, 1 min vorsichtige mischen.
5. Inkubation der Zellen bei 37 °C im CO₂-Inkubator
 - Inkubationsdauer für adhärenente Zellen: 2 h
 - Inkubationsdauer für Suspensionszellen: 4 h

Hinweis: Die optimale Inkubationszeit für diesen Test hängt von der Versuchsanordnung, z. B. Zellentyp, Zellzahl, und Behandlung ab.

Die Optimierung der Inkubationszeit kann durch Ablesen einer Platte zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von XTT-Lösung bestimmt werden.

6. Platte vorsichtig schütteln, um den Farbstoff gleichmäßig zu verteilen.
7. Anschließend erfolgte die Messung der Absorption von Proben und Negativkontrolle (Blank).

Wellenlängenbereich für die Proben: 450 – 500 nm

Wellenlängenbereich für die Hintergrundabsorption (Blank): 630 – 690 nm

Danach wird die Hintergrundabsorption (Negativkontrolle) von der Probenabsorption subtrahiert, um normalisierte Extinktionswerte zu erhalten:

$$A = A_{450-500 \text{ nm}} (\text{Test}) - A_{450-500 \text{ nm}} (\text{Blank}) - A_{630-690 \text{ nm}} (\text{Test})$$

8. Die Absorptionswerte der normalisierten Daten (Y-Achse) werden gegen die experimentellen Parameter, z. B. Zellzahl, Stimulation (X-Achse) aufgetragen.