

## PRODUKT INFORMATION

### Sulforhodamine B Cytotoxicity Assay

**Kat.-Nr. 39906**

#### **Produktbeschreibung:**

**Allgemein** Der Sulforhodamin B (SRB) Zytotoxizitätsassay, der 1990 entwickelt wurde, bleibt eine der am weitesten verbreiteten Methoden für in vitro Zytotoxizitätsscreenings. Der Test beruht auf der Fähigkeit von SRB, an Proteinkomponenten von Zellen zu binden, die an Gewebekulturplatten fixiert wurden. Der SRB-Assay ist sensitiv, einfach, reproduzierbar und schneller als die Formazan-basierten Assays und ergibt eine bessere Linearität, ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis und hat einen stabilen Endpunkt, der keine zeitsensitive Messung erfordert die MTT- oder XTT-Assays. Dieser Test wurde am National Cancer Institute (NCI) für das Hochdurchsatz-Wirkstoff-Screening verwendet.

---

**Inhalt** Der Kit ist ausreichend für 1000 Reaktionen.

---

**Features**

- SRB ist ein hellrosafarbener Aminoxanthenfarbstoff mit zwei Sulfonsäuregruppen, die unter milden sauren Bedingungen an basische Aminosäurereste binden und unter basischen Bedingungen dissoziieren. Da die Bindung von SRB stöchiometrisch ist, ist die Menge an Farbstoff, die aus angefärbten Zellen extrahiert wird, direkt proportional zur Zellmasse.
- Der fixierte Farbstoff wird solubilisiert und photometrisch bei OD 540 nm mit einem Referenzfilter von 690 nm gemessen. Die OD-Werte korrelieren mit dem Gesamtproteingehalt und damit mit der Zellzahl.

---

**Lagerung** Alle Kitkomponenten werden lichtgeschützt bei + 15 °C bis 30 °C gelagert.

---

#### **Protokoll**

**Waschlösung:** Verdünnen der 10X- Farbstoff-Waschlösung mit Wasser (9 Volumen Wasser plus 1 Volumen Farbstoff-Waschlösung 10x).

**Sulforhodamin B-Lösung:** Inhalt des SRB Dye-Fläschchens (0,4 g) mit 100 ml Waschlösung (Farbstoff-Waschlösung 1X) auflösen. Die Lösung lichtgeschützt bei Raumtemperatur lagern.

Einige Komponenten dieses Kits sind potenziell karzinogen oder ätzend. Es ist ratsam, im Abzug zu arbeiten sowie eine Schutzbrille, Handschuhe und Maske zu tragen.

1. Zellen einer 96-Well Platte in 200 µl Wachstumsmedium kultivieren.

**HINWEIS:** Die optimalen Bedingungen für die Überwachung der Zytotoxizität bestehen darin, die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase zu haben und nicht mehr als  $10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> zu überschreiten.

# PRODUKT INFORMATION

## Sulforhodamine B Cytotoxicity Assay

**Kat.-Nr. 39906**

2. Vorsichtig 100 µl kaltes Fixierungsreagenz in jede Vertiefung geben.
3. Inkubiere die Platte für 1 Stunde bei 4°C.
4. Waschen Sie die Wells viermal mit 200 µl / Well destilliertem oder deionisiertem Wasser und entfernen Sie überschüssiges Wasser mit Papiertüchern. Das Waschen entfernt überschüssiges Fixiermittel und Serumproteine.
5. Inkubieren der Zellen in einem 37 °C-Inkubator für 45 min, um überschüssiges Wasser zu entfernen (oder Trocknen der Platten über Nacht, wenn eine Lagerung erforderlich ist).

**HINWEIS:** Nach dem Fixieren und Trocknen können die Platten unbegrenzt bei Raumtemperatur gelagert werden.

6. 100 µl Sulphorhodamin B-Lösung in jede Vertiefung der trockenen 96-Well-Platten geben und 30 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubieren.
7. Entfernen der Sulforhodamin B-Lösung, indem die Platten viermal schnell mit Waschlösung gewaschen werden.
8. Trocknen der Platten an der Luft, bis keine Feuchtigkeit mehr sichtbar ist.

**HINWEIS:** Sobald die Sulphorhodamine B-Lösung hinzugefügt wurde, sollten die Platten vor Licht geschützt werden.

9. Lösen des gebundenen SRB durch Zugabe von 200 µl SRB-Solubilisierungspuffer zu jeder Vertiefung und Schütteln für 5 min auf einer Schüttelplattform.
10. Die optische Dichte (OD) bei 550-580 nm messen, 565 nm ist das Absorptionsmaximum mit einem Mikroplatten Reader. Wenn eine intensive Farbe sichtbar wird (> 1,8), kann stattdessen bei 490-530 nm gemessen werden. Die Hintergrundabsorption wird mit einem Referenzfilter bei 690 nm gemessen.

Die OD von SRB in jeder Vertiefung ist direkt proportional zur Zellzahl, so dass die OD-Werte gegen die Konzentration aufgetragen und die IC 50 bestimmt werden können.

---

### Berechnung der Ergebnisse

Berechnen Sie die prozentuale Zytotoxizität für eine gegebene experimentelle Behandlung, indem Sie die durchschnittlichen Extinktionswerte der experimentellen Zellkontrolle verwenden. Stellen Sie sicher, dass die Absorptionen mit den zellfreien Mediumkontrollen ausgeblendet werden.

$$\% \text{ Zytotoxizität} = (100 \times (\text{Zellkontrolle} - \text{experimentell})) \div (\text{Zellkontrolle})$$

Ver 0118