aCella™ -TOX 细胞毒性检测试剂盒

在 Veritas™ 微孔板发光检测仪上的应用

1. 应用说明

Cell Technology 公司的 aCella-TOX 试剂盒是通过检测哺乳动物细胞或者细菌细胞的甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）活性来定量细胞毒性，aCella-TOX 试剂盒的检测量最低可达 5 个细胞/100ul 培养液。

在糖酵解过程中 GAPDH 催化 3-磷酸甘油醛(GAP)转化成 1,3-磷酸甘油酸酯(1,3-BPG)的氧化磷酸化反应，1,3-BPG 在磷酸甘油酸酯激酶(PGK)作用下脱磷酸产生 ATP，ATP 可以通过萤光素酶/萤光素生物化学反应发光检测而定量。

Veritas™ 微孔板发光检测仪采用独特的光检系统使得在 aCella-TOX 试剂盒分析中能达到最高灵敏度和最宽线性范围，检测使用 aCella-TOX 试剂盒。

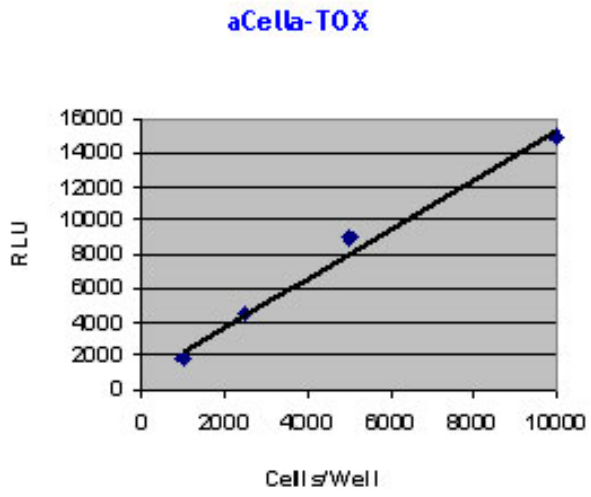

图 1：将不同浓度的 Jurkat 细胞铺板，每孔加入 NP-40 细胞毒性分析试剂，采用 aCella-TOX 来检测 G3PDH 酶活性，图中数据点 RLU 为三次测量平均值。

2. 所需器材

- Veritas™微孔板发光检测仪
- 白色不透明 96 孔板(E&K Scientific EK-25075)
- Cell Technology， aCella-TOX 检测试剂盒。

3. 实验方案

3.1 试剂制备

小瓶 A：酶检测试剂（4×）

试剂瓶 A：酶检测稀释液 A

小瓶 B：检测试剂（50×），含萤光素酶/萤光素底物

试剂瓶 B：检测试剂稀释液 B（5.5×）

小瓶 C：三磷酸甘油醛 G3P

小瓶 D：5×裂解试剂

3.1.1 使用前，置于冰上解冻试剂 A（4× 浓缩液），配制 2×工作液，按照 1:2 的比例将 4×的酶检测稀释液 A 和酶检测试剂 A 稀释。

3.1.2 分装后，在至少-70°C 条件下冻存剩余小瓶试剂 A

3.1.3 接下来，快速解冻小瓶试剂 C。每毫升 2×酶检测试剂中加入 3.5ul 的小瓶试剂 C，配制试剂要足够当天实验所需。在低于-70°C 条件下，剩余的 2×酶检测试剂两周内活性不会损失。

3.1.4 解冻试剂瓶 B(5.5X 浓缩液)，使用前用试剂级去离子水按 1:5.5 倍稀释。

3.1.5 分装剩余试剂保存在-20°C 到-70°C 条件下。

3.1.6 使用前，置于冰上解冻小瓶 B 中试剂(检测试剂 50X 浓缩液)。

3.1.7 分装并-70°C 冻存剩余试剂。

3.1.8 向样品中加入检测试剂前，用检测试剂稀释液 B 按 1:50 倍比例稀释。

3.1.9 向每个样品中各加 50ul

注意：混合试剂避光保存。

3.1.10 使用前用去离子水按 1:5 倍比例稀释小瓶 D 中试剂，稀释试剂可室温保存。

注意：使用其他裂解试剂会干扰测量信号，TritonX 100 会严重抑制发光信号。

注意：所有试剂避免反复冻溶。

3.2 仪器准备

3.2.1 双击 Veritas 图标运行软件。

3.2.2 在"Welcome to Veritas"对话框中点击"Create New Protocol"

3.2.3 提示有新的工作方案生成时，选择"0 injectors"。

3.2.4 首次运行前修改延迟时间，测量次数和重复测量延迟时间，"Integration time"选择为 1s。

3.2.5 接下来，选择想要检测的孔。可以选择"Save Protocol As"以便将来使用，或者选择"Finish"不保存运行该方案。

原平皓生物 www.yph-bio.com

3.3 样品分析—细胞毒素

3.3.1 对照

A. 阴性对照

1. 仅仅用细胞培养基铺板，三次平均来获得测量背景值。

2. 另外，可以用未处理细胞或者溶解于溶剂/机械法处理的细胞来铺板。

B. 阳性对照

1. 使用裂解液处理细胞检测释放的总 GAPDH，每 100ul 样品中加入 5-10ul 0.2% NP-40。

注意：有些细胞系可能需要高浓度 NP 40 才能裂解，但我们建议尽可能使用较低浓度的裂解液。

3.3.2 100ul 板孔中，每孔要有 500-10,000 个细胞，做 3 个平行。细胞可以种入无血清培养基或者 10%血清的培养基。但是若使用 10%血清培养基，种入细胞每孔应是 10,000-20,000 个。

技术提示 1：实验开始前，测定所检测细胞系对 aCella-TOX 系统的线性应答范围非常重要，因为在不同细胞系中 GAPDH 表达会有变化。

滴加细胞溶液(Cell Technology 建议每孔 1,000-20,000 个细胞)，接着向每孔中加入细胞裂解液，孵育时间与检测时间相同。而后加入酶分析和检测试剂，测量发光值。使用测量值在线性范围内的细胞浓度做进一步实验。

3.3.3 样品中加入细胞毒素。

3.3.4 根据实验方案孵育以后：

A. 在阳性对照样品中加入 5-10ul 细胞裂解液。

B. 而后向样品和阳性对照，每孔中加入 100ul 2×酶检测试剂。

3.3.5 每孔中迅速加入 50ul 稀释检测试剂(Vial B)，为了获得最大信号值，孵育 2-5min。

技术提示 2：延长孵育时间或许会使分析数据超出线性范围，酶试剂持续生成 ATP 直到反应组分的任何一种耗尽。建议 5—25min 内在不同时间点读值，以得到最佳线性。

3.3.6 样品板放入 Veritas™ 微孔板发光检测仪中点击“Start”开始测量。每行所选择孔检测完后， RLU 值会以 Excel 电子表格形式显示。如果测量中遇到其他困难，请参考疑难解答获取更多信息。

3.3.7 一旦检测结束，就可以通过 Excel 进行数据分析。

3.3.8 检测完成后取出样品板。

3.3.9 结果计算

A. 细胞毒素%＝100×（实验样品—阴性对照）/（GAPDH 最大释放值—阴性对照）

3.4 样品分析—细胞耦联/抗体耦联细胞毒素

3.4.1 对照

a) 阴性对照：测目标细胞和受动细胞自然释放的 GAPDH 值，做三次平行实验。测量前参考技术提示＃1。

b) 阳性对照：目标细胞铺板，做三个平行，细胞裂解液处理细胞(vial D: 5-10 µL per well)测量 GAPDH 的最大释放值

3.4.2 每孔目标细胞数为 500-10000。

注意：分析抗体耦联细胞毒素，目标细胞需要和要研究抗体孵育，洗脱去除多余抗体，然后铺板，残余抗体不会干扰 aCella-TOX 分析信号。

3.4.3 根据实验方案孵育后，向目标细胞阳性对照孔中加入 5-10ml 细胞裂解液，静置 5min。

3.4.4 然后向每孔加入 100ml 2×酶分析试剂（vial A）

3.4.5 每孔立刻加入 50ml 稀释检测试剂(vial B)，为获得最大信号值，需孵育样品 2-5min，参考技术提示＃2。

3.4.6 样品板放入 Veritas™ 微孔板发光检测仪中点击“Start”开始测量。每行所选择孔检测完后， RLU 值会以 Excel 电子表格形式显示。如果测量中遇到其他困难，请参考疑难解答获取更多信息。

3.4.7 一旦检测结束就可以通过 Excel 进行数据分析。

3.4.9 取出样品板

3.4.10 结果计算

A. 目标细胞：受动细胞 1：1 细胞毒素％＝100×【（B1 平均值－A 平均值）－C1 平均值】/(E-D)

A=目标细胞自发 GAPDH 释放值

B＝目标细胞受受动细胞影响 GAPDH 释放值(Target:Effector)

C＝受动细胞自发 GAPDH 释放值，不同比率下的受动细胞

D＝培养基背景值

E＝目标细胞 GAPDH 最大释放值

4. 关于 Veritas™ 微孔板发光检测仪

Veritas™ 微孔板发光检测仪是 Turner Biosystems 公司生产的一款专门用于生物发光与化学发光检测的微孔板型发光检测仪。Veritas™ 微孔板发光检测仪发光检测仪具有极高的检测灵敏度（3×10^{-21}moles 荧光素酶）和极宽的检测范围（>9 数量级），可以满足各种发光检测的需求。

5 参考文献

1. Methods and compositions for coupled luminescent assays. United States Patent 6,811,990 Corey and Kinders, issued November 2, 2004.

2. Corey, M. J. and Kinders, R. J. (2005) "Coupled Luminescent Methods in Drug Discovery: 3-Min Assays for Cytotoxicity and Phosphatase Activity" Drug Discovery Handbook, Ed. Shayne Cox Gad, published by John Wiley & Sons, Inc., pp. 689-731

3. Corey, M.J., et al., "A Very Sensitive Coupled Luminescent Assay for Cytoxicity and Complement-Mediated Lysis," Journal of Immunological Methods 207:43-51, 1997.