

APPLICATION NOTE

SpectraMax iD3微孔板读板机上进行细胞活性实验来评估细胞健康状态

简介

从活性和凋亡等多个表征评估细胞健康状态能协助我们深入了解多种情况下，包括候选药物，特定通路的激活、抑制剂处理以及报告基因的表达所带来的影响。目前有多种方法可用于测定细胞健康状态，其中比较常见的是通过微孔板读板机结合荧光检测法。该应用指南展现了在SpectraMax® iD3多功能微孔板读板机上应用EarlyTox™ 系列细胞活性检测试剂盒进行细胞健康评估。

EarlyTox™细胞死活检测试剂盒

该试剂盒包含两个适用于标记哺乳动物细胞死活的标记物。其中，Calcein AM广泛用于标记活细胞。非荧光的Calcein AM可穿透完整的细胞膜，进入胞浆后在细胞内脂酶的作用下转换成具有荧光的Calcein。因此，在Calcein AM标记下活细胞胞浆会发出强烈的绿色荧光。有些实验中只涉及到活细胞的标记，如细胞增殖实验等，仅需要EarlyTox™ Live Cell检测

试剂盒提供的Calcein AM (货号 R8342 for 探索包装, 货号 R8343 大包装)。

Ethidium homodimer-III (EthD-III) 是几乎无荧光的标记物，其不具有穿透完整细胞膜的能力。在细胞死亡过程中，往往会出现细胞膜完整性的受损。此时，EthD-III可进入细胞并结合核酸，在死细胞中产生强烈的红色荧光。EthD-III染色可用于准确评估细胞毒性事件对膜完整性的影响。

Calcein 和 EthDIII的荧光信号均可用SpectraMax iD3微孔板读板机进行检测，并能在SoftMax® Pro软件中结合预设的EarlyTox Live/Dead 模板迅速完成分析。

优点

- 针对SpectraMax iD3微孔板读板机全面优化的检测方法，节约实验开发所需的时间
- 简单，均一的实验流程更大程度减少细胞处理的步骤
- 高分辨率触摸屏方便进行快速方法学的设定
- SoftMax Pro软件预设的模板加速数据的分析

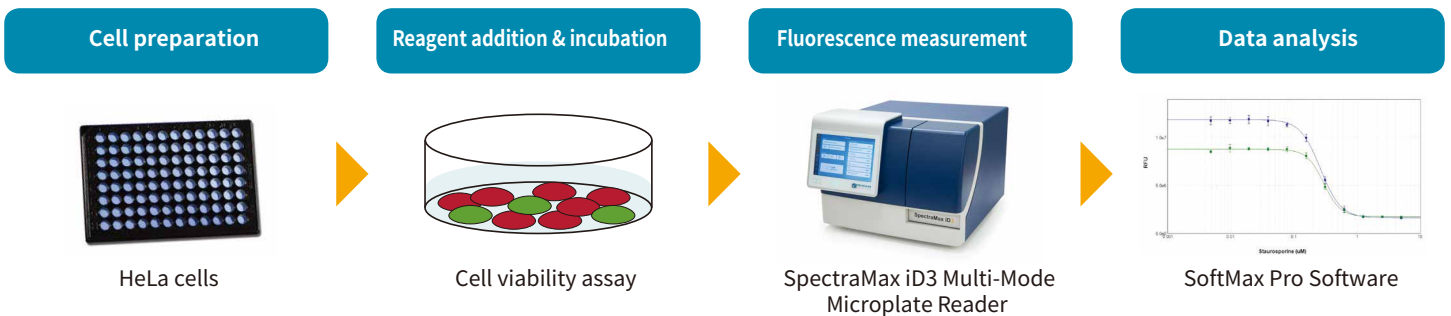


图1: 细胞活性检测实验流程代表图

EarlyTox Glutathione 检测试剂盒

该试剂盒利用对GSH具有高亲和力的细胞膜可渗透染料monochlorobimane (MCB)进行细胞内GSH水平的检测。在内源GlutathioneS-transferase (GST) 酶处理下, MCB与GSH进行反应并产生394 nm 激发, 490 nm 发射的蓝色荧光, 强度与细胞内GSH的水平对应, 并随着凋亡的发生下降。与主流的检测方法不同, EarlyTox Glutathione检测法可直接在微孔板中分析完整的活细胞, 无需进行细胞收集, 离心等耗时且易引入误差的操作。同时, 预设的EarlyTox Glutathione模板简化了仪器的设置和软件分析过程。

EarlyTox Caspase-3/7 R110 检测试剂盒

EarlyTox Caspase-3/7 R110 检测试剂盒专门为微孔板读板机提供了一步式均相检测方法。荧光底物 (Ac-DEVD) 2-R110含有2个DEVD 共识目标序列, 并在细胞裂解产物中相关酶的作用下逐步完全水解, 释放绿色荧光染料rhodamine 110 (R110) 并伴随显著的荧光信号 (490 nm激发, 520 nm发射) 增加。简化的操作流程降低了对细胞数量的需求, 同时避免多步操作所带来的误差。相应的SoftMax Pro模板库中提供预设模板用于EarlyTox R110采集和分析。

材料

- EarlyTox™ 细胞死活检测试剂盒
- 探索包装 (两块微孔板通量, Molecular Devices 货号 R8340)
- 大包装 (十块微孔板通量, Molecular Devices 货号 R8341)
- EarlyTox™ Glutathione 检测试剂盒
- 探索包装 (两块微孔板通量, Molecular Devices 货号 R8344)
- 大包装 (十块微孔板通量, Molecular Devices 货号 R8345)
- EarlyTox™ Caspase-3/7 R110 Assay Kit
- 探索包装 (两块微孔板通量, Molecular Devices 货号 R8346)
- 大包装 (十块微孔板通量, Molecular Devices 货号 R8347)
- HeLa 细胞 (ATCC 货号 CCL-2)
- Staurosporine (Sigma 货号 S5921)
- 96孔黑色底部透明微孔板 (Corning 货号 3904)
- SpectraMax iD3 多功能微孔板读板机

方法

细胞处理:

HeLa细胞以100 μ L体系, 20,000个每孔的密度铺于黑色底部透明板中。在37°C, 5% CO₂ 培养箱培养过夜, 细胞贴壁后, 用不同的方法诱导凋亡。对于细胞死活检测, 用2倍梯度稀释浓度范围为10 μ M 到40 nM的Staurosporine处理细胞24小时。对于Glutathione 和 Caspase-3/7 R110 检测, 则用2倍梯度稀释浓度范围为5 μ M 到5 nM的Staurosporine处理细胞4小时。每个药物浓度设置4重复。

EarlyTox 细胞死活检测试剂盒

配置2倍工作处理液: 在PBS缓冲液中加入Calcein AM和EthD-III 储液至染料终浓度均为6 μ M。每实验孔中加入100 μ L 2倍工作处理液使最终反应体系为200 μ L, 染料终浓度均为3 μ M。室温孵育1小时后用SpectraMax iD3微孔板读板机进行顶部或底部读取。参数设置依照表1所示使用SoftMax Pro 完成。注意, 必要时也可以先移除培养液后加入1倍工作处理液进行染色, 有利于降低背景荧光信号。

SoftMax Pro软件预设的EarlyTox Live Dead assay 模板会自动计算绿色荧光/红色荧光比例, 并根据药物浓度进行作图。如有需求, 模板也可以计算死活细胞的比例, 不过必须在实验板中设置额外的对照。

EarlyTox Glutathione 检测试剂盒

配置20 μ M MCB工作处理液: 稀释 20 μ L 10 mM MCB储液于10 mL PBS中。移除实验板的培养基后每孔细胞加入100 μ L MCB工作处理液, 37°C进行孵育。孵育1小时和2小时后用SpectraMax iD3微孔板读板机按照表1的参数进行荧光检测。

EarlyTox Caspase-3/7 R110 检测试剂盒

配置荧光底物工作液: 按照50 μ L 每 1 mL的比例加入酶底物 (AC-DEVD) 2-R110 (2 mM) 至细胞裂解或检测缓冲液中。每孔细胞中加入100 μ L荧光底物工作液, 使终体系为200 μ L每孔, 底物终浓度为50 μ M。室温孵育1小时和2小时后用SpectraMax iD3微孔板读板机按照表1的参数进行荧光检测。

Parameter	EarlyTox Live/Dead	EarlyTox Glutathione	EarlyTox Caspase-3/7 R110
Read mode	Fluorescence	Fluorescence	Fluorescence
Read type	Endpoint	Endpoint	Endpoint
Wavelengths	Lm1: Ex = 495 nm, Em = 530 nm Lm2: Ex = 530 nm, Em = 645 nm	Ex = 394 nm, Em = 490 nm	Ex = 470 nm, Em = 520 nm
PMT and Optics	PMT gain: Automatic Integration time: 500 ms Read from bottom	PMT gain: Automatic Integration time: 500 ms Read from top or bottom	PMT gain: Automatic Integration time: 500 ms Read from top or bottom

表1: SpectraMax iD3 多功能微孔板读板机参数设定。类似的设定可用于其他具有荧光检测功能的SpectraMax微孔板读板机

结果

EarlyTox 细胞死活检测试剂盒

Staurosporine 处理在Hela 细胞上引起明显的浓度反应关系，可以通过计算活细胞（绿色荧光）和死细胞（红色荧光）的比例轻易进行量化（图2）。一般来说，孵育2小时的细胞样本的RFU高于孵育1小时（结果未显示）。此次检测中使用4参数曲线拟合出 EC_{50} 值为300 nM。

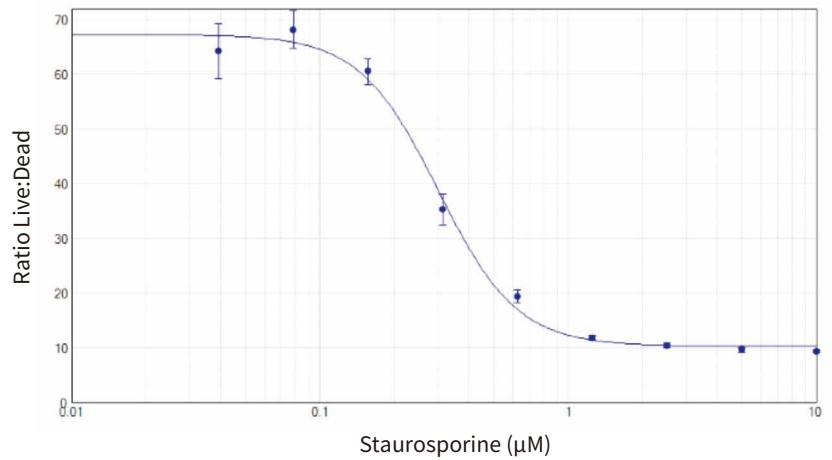


图2: EarlyTox细胞死活检测: Staurosporine处理Hela细胞24小时的浓度反应曲线。 Calcein AM 和 EthD-III孵育细胞一小时后进行检测。依据绿（530 nm发射波长）/红（645 nm发射波长）RFU 值的比值绘制浓度曲线。数据使用4参数曲线拟合。 EC_{50} 值为300 nM。

EarlyTox Glutathione 检测试剂盒

Staurosporine 处理4小时后HeLa细胞出现凋亡，并伴随细胞内Glutathione水平的下降，其可用EarlyTox Glutathione 检测法进行分析。随着Staurosporine浓度的提升，荧光信号逐渐下降并可用SpectraMax iD3 微孔板读板机检测。结果在SoftMax Pro 软件中使用4参数曲线拟合。虽然荧光信号值随着时间的推移而增加，孵育1小时和孵育2小时所得的 EC_{50} 值是相近的263 nM和295 nM（图3）。

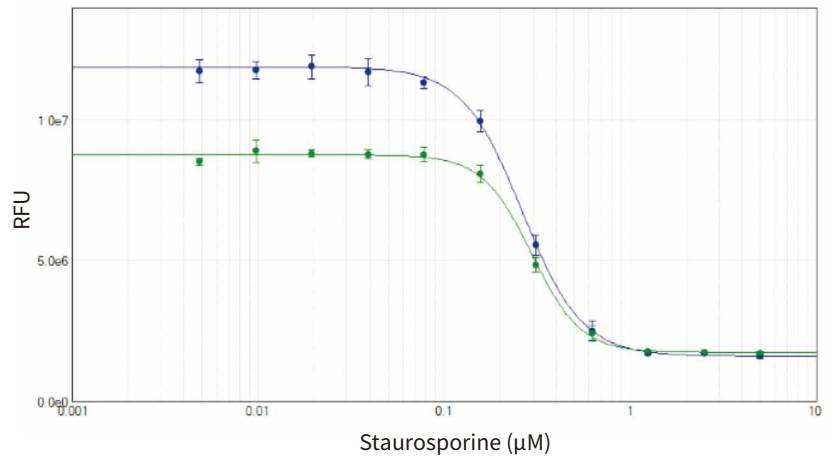


图3: EarlyTox Glutathione 检测: Staurosporine处理Hela细胞4小时的浓度反应曲线。 细胞分别和染料孵育1小时（绿线）和2小时（蓝线）。在SoftMax Pro 软件中使用4参数曲线拟合。 EC_{50} 值分别为263 nM和295 nM。

EarlyTox Caspase-3/7 R110 检测试剂盒

Staurosporine 处理4小时后HeLa细胞出现凋亡并用EarlyTox Caspase-3/7 R110 检测法进行分析。凋亡细胞对应的荧光信号可用SpectraMax iD3微孔板读板机进行检测。结果在SoftMax Pro软件中使用4参数曲线拟合。底物孵育1小时和2小时所得的 EC_{50} 值是相近的193 nM和200 nM（图4）。

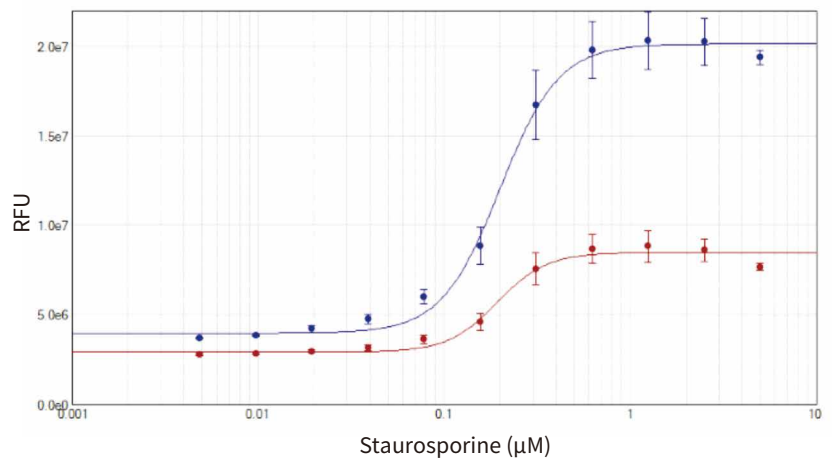


图4. EarlyTox Caspase-3/7 R110 检测: Staurosporine处理Hela细胞4小时的浓度反应曲线。 细胞分别和染料孵育1小时（红线）和2小时（蓝线）。在SoftMax Pro 软件中使用4参数曲线拟合。 EC_{50} 值分别为193 nM和200 nM。

总结

结合SpectraMax iD3微孔板读板机，EarlyTox细胞活性系列试剂盒提供了直接、方便的细胞死活或凋亡的检测方法，并且使用微孔板进一步提升通量。不同孵育时间的结果一致性增加了实验流程的灵活性。SoftMax Pro 软件中预设的模板提供了优化的检测参数设定并通过自动数据分析减少获得数据所需的时间。

SpectraMax iD3 多功能微孔板读板机

SpectraMax iD3微孔板读板机设计上引入了大尺寸，高分辨率触摸屏并内嵌软件包便于用户自定义模板，使用预设模板和在不需专用电脑工作站的前提下进行实验。仅需轻轻一点，内置的近场通讯（NFC）功能就能提供自定义模板和数据，节约您的宝贵时间。



更多精彩内容
尽在官方微信

美谷分子仪器 (上海) 有限公司

全国咨询服务热线: 400-820-3586
上海 电话: 86-21-3372 1088
北京 电话: 86-10-6410 8669
成都 电话: 86-28-6558 8820
台北 电话: 886-2-2656 7585
香港

www.MolecularDevices.com.cn Email: info.china@moldev.com
传真: 86-21-3372 1066
传真: 86-10-6410 8601
传真: 86-28-6558 8831
传真: 886-2-2894 8267
传真: 852-2289 5385

地址: 上海市长宁区福泉北路 518 号 1 座 501 室 200335
地址: 北京市朝阳区广渠东路 3 号中水电国际大厦 612 & 613 室 100124
地址: 成都市锦江区东御街 18 号百扬大厦 2208 室 610016
地址: 台北市内湖区堤顶大道二段 89 号 3 楼
地址: 香港中环皇后大道中15号置地广场 公爵大厦21楼

