

利用SpectraMax i3x多功能微孔板读板机所具有的超灵敏化学发光检测功能进行细胞活力和细胞毒性的评价

简介

SpectraMax i3x是Molecular Devices公司最新推出的一款多功能微孔板读板机，可利用仪器所具有的化学发光检测功能，进行细胞活力和细胞毒性相应检测。仪器可灵敏、快速检测出培养基中活细胞的数目和经相应处理后细胞毒性情况。Promega公司推出的CellTiter-Glo试剂是利用了萤火虫荧光素酶反应体系中需要ATP参与才能使其发光的特点，化学发光信号强弱取决于培养基中ATP含量的高低，也就是依赖于其中活细胞数目的多少。来自于BioVision公司基于生物化学发光原理的细胞毒性检测试剂盒，目的是检测腺苷酸激酶(AK)的含量，AK为一种存在于所有细胞中的常见蛋白，当破坏了细胞膜完整性后其会释放至培养基中，AK可转化ADP至ATP，所以可以利用类似方式进行化学发光检测。

材料

- CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega P/N G7570)
- Bioluminescence Cytotoxicity Assay Kit (BioVision P/N K312-500)
- HeLa 细胞(ATCC P/N CCL-2)
- 黑色底透 96孔细胞培养板 (Corning P/N 3904)
- 白色96孔细胞培养板(Corning P/N 3917)
- SpectraMax i3x多功能微孔板读板机

方法

准备试剂

使用前预先将CellTiter-Glo缓冲液和底物解冻并且平衡其至室温，将CellTiter-Glo缓冲液加至含有CellTiter-Glo底物的棕色小瓶中，按照试剂盒说明书提示，将试剂轻轻反复颠倒进行混匀。对于生物化学发光细胞毒性检测试剂盒，其中包含了1瓶AK检测试剂，此试剂使用前预先将1.1ml AK试剂缓冲液加入其中并轻轻混匀，需在室温环境下平衡15分钟后使用。这个10X的AK试剂的储存液需要稀释后才能成为试剂缓冲液。

细胞数目与化学发光信号关系

Hela 细胞培养在含有10%胎牛血清和双抗的MEM培养基中，细胞经胰酶消化后，使其悬浮于培养基中进行计数。处理后的细胞铺在96孔板中，经细胞培养基稀释后其密度从50,000细胞每孔/100ul至10个细胞每孔/100ul。如果将细胞铺在384孔板时，稀释后密度从12,500细胞每孔/25ul至6个细胞每孔/25ul。对照孔中仅需加入细胞培养基用于检测其背景的化学发光信号值。

细胞试验过程中，精确的细胞数目可用于生成标准曲线，将不同体积的CellTiter-Glo试剂加入相应的孔板中，如100ul(96孔板)或25ul(384孔板)。将微孔板放置于振荡器上轻混2分后，室温条件下孵育10分钟，等化学发光信号值稳定后再进行检测。

优势：

- 仪器具有超高灵敏度化学发光检测功能，最低至10个细胞/每孔；
- 微孔板读板高度自动优化设置，可提高检测信号强度
- 软件预置模板可以更快分析出检测结果

ATP标准曲线

ATP以1:10稀释度进行稀释后加入96孔板和384孔板中，浓度从10uM至1nM，不加细胞的孔作为空白孔。CellTiter-Glo试剂可用于检测ATP，检测前可利用SpectraMax i3x具有的微孔板优化设置和读取高度优化设置功能，帮助你获得更佳信号值。

细胞活力和细胞毒性试验

将Hela细胞预铺在白色底透的细胞培养型96孔板中，密度为15,000/孔，培养过夜。第二天在细胞孔中加入十字孢碱(staurosporine)和茴香霉素(anisomycin)这两种化合物来诱导细胞凋亡。这两种化合物起始浓度都为50uM，并以1:2方式稀释至24nM。再经过24小时孵育以后，分别使用CellTiter-Glo细胞活力检测试剂盒和BioVision的细胞毒性检测试剂盒对处理后的细胞进行检测。

对于CellTiter-Glo细胞活力检测试验，将100ul的CellTiter-Glo试剂加入含有细胞的白色微孔板中，等10分钟左右，当细胞彻底裂解以后再进行相应检测。

对于BioVision细胞毒性检测试验，每孔中取100ul处理后的细胞培养基，将其转移至白色微孔板中，并在白色微孔板中加入100ul的AK工作液，此方法需要在30分钟内完成检测。

仪器设置和结果分析

SpectraMax i3x读板机参数设置如表一所示。使用专业级别的SoftMax[®] pro软件后，可直接获得平均相对化学发光信号值(RLU)和标准偏差值。直接绘制出细胞稀释度曲线和ATP标准曲线，选择其中的4参数拟合方式进行拟合后快速计算出其IC50值。软件预置模板库中还有针对CellTiter-Glo检测试验的模板可方便直接调用。

结果

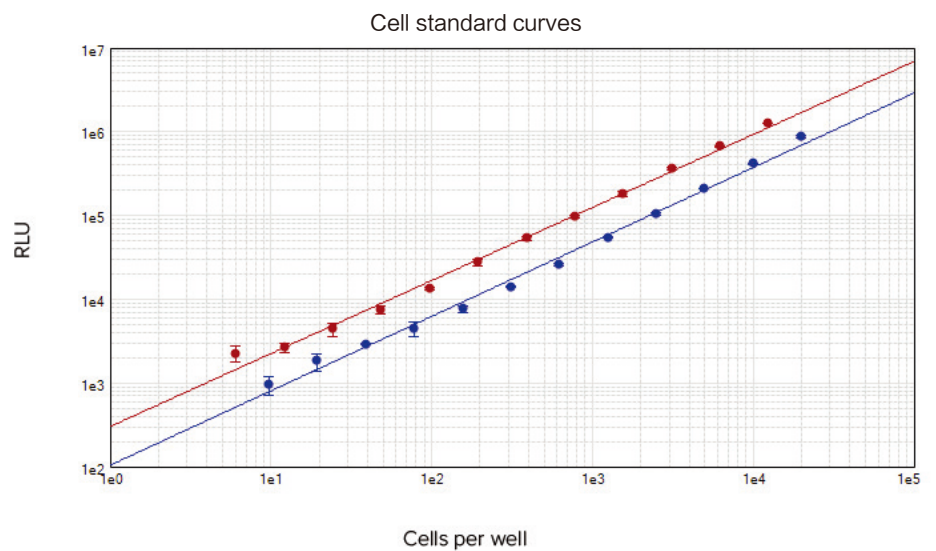
SpectraMax i3x读板机针对96孔板和384孔板进行检测时，最低检测下限可至10细胞每孔。此种检测方法的灵敏度远远高于标准比色法和绝大多数荧光法。CellTiter-Glo试剂检测线性范围覆盖所有细胞浓度区间，动态学检测范围大于3个数量级且 $r^2 > 0.99$ (图一)。

Parameter	Selected setting
Optical configuration	Monochromator
Read Mode	LUM
Read Type	Endpoint
Wavelengths	All Wavelengths
Plate types (specific to each assay format)	96 Well Costar clear 384 Well Greiner clear*
PMT and Optics	Integration Time: 1000 ms Read Height: 5.86 to 8.09 mm (assay dependent)**
More Settings	Show Pre-Read Optimization Options

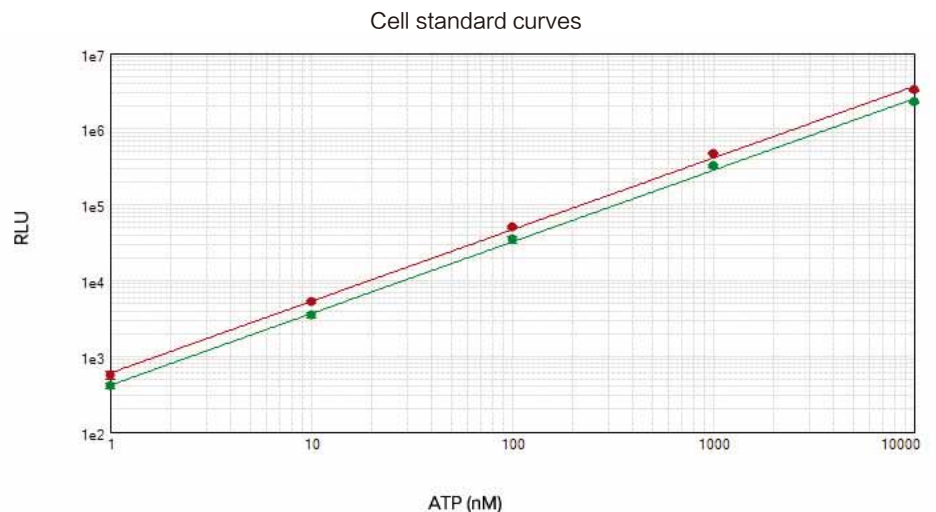
* The 384-well microplate plate definition was optimized using the Microplate Optimization Wizard in SoftMax Pro Software.

** Read height was optimized for each assay using the Read Height Optimization Wizard to ensure optimal signal detection.

表一：化学发光检测时如何设置读板机的参数



图一：图中分别是96孔板的标准曲线(蓝色圆圈)和384孔板的标准曲线(红色圆圈)，在每种类型的微孔板中，检测下限可至10个细胞每孔，两条曲线的标准方差值 $r^2 > 0.99$



图二：96孔板中ATP标准曲线(红色圆圈)和384孔板中ATP标准曲线(绿色圆圈)，两个标准曲线的 $r^2 = 0.999$ 。

ATP标准曲线既可以验证试验条件也可以用来计算细胞内ATP的含量。因此，ATP标准品浓度范围从1nM至10uM产生的化学发光信号范围可覆盖整个不同细胞数目孔中产生的信号值(图二)，检测的线性范围大于四个数量级。

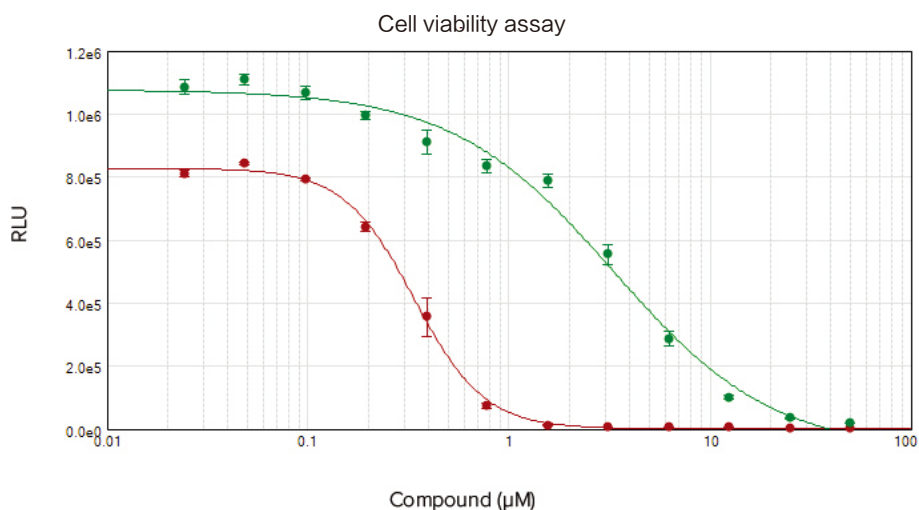
经十字孢碱(staurosporine)和茴香霉素(anisomycin)等化合物处理后细胞其活力的变化可通过检测ATP水平而实现(图三)。细胞毒性可以通过检测其AK量变化而实现(图四)。十字孢碱(0.34uM和0.15uM)和茴香霉素(3.30uM和2.28uM)两次处理试验获得相似的IC50值。

结论

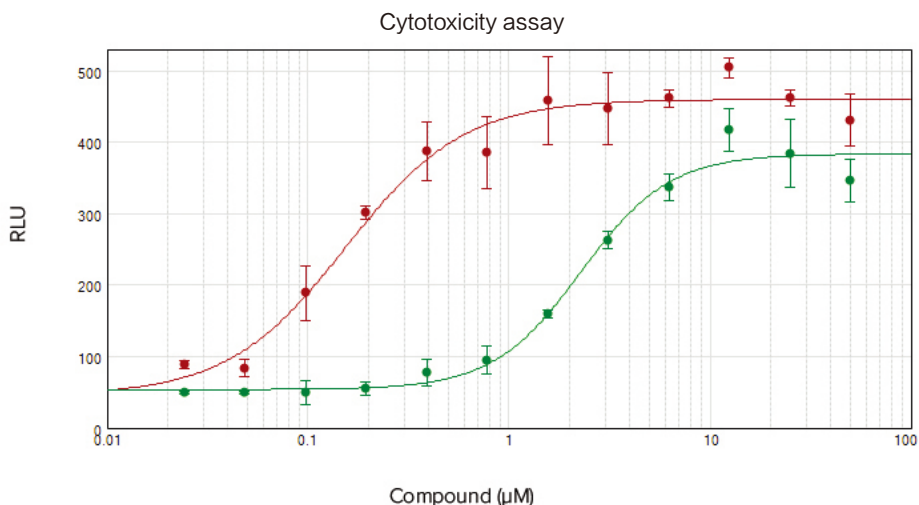
在利用SpectraMax i3x读板机化学发光检测功能进行基于ATP变化的细胞活力和基于AK变化的细胞毒性检测时其表现出了超高灵敏性，检测下限可至10个细胞每孔。可通过专业级别的SoftMax Pro 软件进行四参数拟合，随后直接计算出IC50值。软件可以自动优化微孔板的检测高度，可帮助用户获得最佳的信号值。

主机除了具有化学发光检测功能以外，SpectraMax i3x读板机可升级具有更多检测功能以满足用户对不同试验的不同检测需求。此仪器的光吸收和荧光强度检测功能，光源采用了专利的光谱融合技术(Spectra Fusion™ Illumination)使其既可以兼顾了波长灵活性也可以获得最佳检测信号。

主机可加入具有新检测功能的卡盒，用户自己可随时进行功能升级，包括时间分辨荧光检测功能和Western Blot检测功能，也可选配Spectra® MiniMax™ 300细胞成像模块，扩展此读板机检测能力和应用范围。仪器所有功能均可以使用一种软件进行操作，即专业级别的SoftMax Pro软件，其中包含了CellTiter-Glo等近120预置检测模板可方便用户自己快速进行数据收集和数据分析。



图三: Hela细胞经十字孢碱(红色圆圈)和茴香霉素(绿色圆圈)处理24小时后浓度效应学曲线，十字孢碱IC₅₀值为0.34uM，茴香霉素IC₅₀值为3.30uM。



图四: Hela细胞经十字孢碱(红色圆圈)和茴香霉素(绿色圆圈)处理24小时后浓度效应学曲线。使用BioVision细胞毒性检测试剂盒来检测细胞内AK活性变化，十字孢碱IC₅₀值为0.15uM，茴香霉素IC₅₀值为2.28uM。



扫一扫关注我们
的官方微信