

APPLICATION NOTE

细胞毒性：在 SpectraMax L 化学发光微孔板读板机上用 Lonza ViaLight Plus 和 ToxiLight 检测试剂盒进行细胞毒性检测

简介

生物发光细胞毒性检测能提供更高的检测限、速度和准确性，已有文献证实 (Crouch et al., 1993)。正常细胞在培养过程中保持高水平的 ATP 浓度。在增殖过程中，培养物中的 ATP 总量随细胞数量的增加而增加。相反，死细胞由于合成妥协无法维持高水平的 ATP，因此认为 ATP 水平下降。在培养物中 ATP 水平反映了活细胞数量，ATP 检测已被证实是最重要的预测一般细胞毒性的方法之一。

另一种细胞毒性指标是细胞膜的损伤。它允许试剂 (如碘化丙钠) 进入细胞，细胞成分会分散到周围的介质中。细胞膜损伤时会释放腺苷酸激酶 (AK)，它是真核细胞中普遍存在的一种蛋白 (Squirrell and Murphy, 1997)。

龙沙公司开发的 ViaLight Plus 和 ToxiLight 细胞毒性检测试剂盒利用了细胞的这些特性，通过生物发光的方法检测这些变化。这两种方法的灵敏度都低于 10 个细胞/孔。ViaLight Plus 试剂盒能产生一种长时间的荧光信号，其线性衰减率与细胞数无关。ToxiLight 试剂盒是一种均相的、对细胞无损的方法，可以直接测定孔中活细胞和死细胞的混合总数。该试剂盒也可以用于从实验板孔中取出的培养基样品，如果需要还可以用另一种方法对剩余的培养基进行检测。这对于珍贵样品和需要多种分析的样品是非常好的选择。

方法

人类白血病细胞 K 562 梯度稀释至培养基中，三份每份以 100 μ L 的倍数加至白色化学发光板中。采用 ViaLight Plus 试剂盒检测各孔中的 ATP 水平。每孔中加入 50 μ L 细胞裂解液消化细胞，室温孵育 10 分钟。消化后，每孔加入 100 μ L ATP 监测试剂，混匀后平衡 2 分钟。试剂板放入 SpectraMax L 化学发光微孔板读板机读板，采用 SoftMax Pro 软件中预设的程序 (设置见表 1) 每孔读取 1 秒。实验结果见图 1。

采用 ToxiLight 检测试剂盒时，梯度稀释的 100 μ L K 562 细胞加入白色化学发光板。实验本身对细胞无损伤，但是为了达到检测灵敏度，细胞被裂解释放出总腺苷酸激酶 (AK)。每孔加入 5 μ L ToxiLight 100 % 裂解液，室温孵育 10 分钟。释放出的 AK 用 ToxiLight 检测试剂盒检测。每孔加入 100 μ L AK 检测试剂，混匀并孵育 5 分钟。试剂板放入 SpectraMax L 化学发光微孔板读板机，采用 SoftMax Pro 软件中预设的程序 (设置见表 1) 每孔读取 1 秒。实验结果见图 2。



Table 1. SpectraMax L Microplate Luminometer Settings for ViaLight and ToxiLight Assays

Parameter	Setting
Read Mode	Luminescence
Integration Time	1 sec.
Sensitivity	PMT Setting: AutoRangeTarget Calibration Wavelength: 570 nm
Assay Plate Type	96 - Well Standard

这两种方法都具有良好的灵敏度和重现性。它们简单易用，并且各有其独特的优势。ViaLight 检测试剂盒通过检测消化后释放的 ATP 来判断有多少活细胞存在。与未处理的对照组相比，ViaLight 检测试剂盒可以同时显示细胞增殖和细胞毒性。由于 ToxiLight 试剂盒是非破坏性实验，它只能检测从受损细胞释放的 AK，它是一个更真实的细胞毒性指标。这些细胞一旦释放出 AK，就无法恢复。所以该试剂盒不能判断细胞的健康与否或是否有增殖。

ToxiLight 检测试剂盒的非破坏性取样方式使其能够与其他检测一起进行，实验设计更加灵活。为了证明这一点，我们使用喜树碱(一种 DNA 拓扑异构酶 I 抑制剂)处理 U 937 人白血病细胞，并使用 ViaLight Plus 和 ToxiLight 检测试剂盒(如下所述)进行了检测。

96 孔板中加入 100 μ L U 937 细胞 (5×10^5 细胞/mL)，并往培养基中加入浓度逐渐升高的喜树碱，培养 24 小时。孵育完成后，按照试剂盒中取样方法用 ToxiLight 试剂检测样品。20 μ L 细胞上清转入 96 孔白板中。每孔中加入 100 μ L AK 检测试剂，室温孵育 5 分钟。剩下的培养样品用 ViaLight Plus 检测试剂盒按上面的方法检测。试剂板放入 SpectraMax L 化学发光微孔板读板机，采用 SoftMax Pro 软件中预设的程序(设置见表 1) 每孔读取 1 秒。实验结果见图 3。

认为活细胞减少是细胞毒性造成的假设并不总是正确的。同时采用 ViaLight 和 ToxiLight 检测试剂盒检测是验证这一点的必要工具。在本实验中，ViaLight Plus 检测试剂盒检测出 RLUs 减少，而 ToxiLight 检测试剂盒检测出腺苷酸激酶释放增加。结合这两款试剂盒可以以最小的付出得到更完整的图片(表 2)。采用相同的样本进行检测，孔和孔之间的数据可以直接比较，如果需要，延长 ToxiLight 检测取样过程能得到有用的细胞死亡动力学指标。

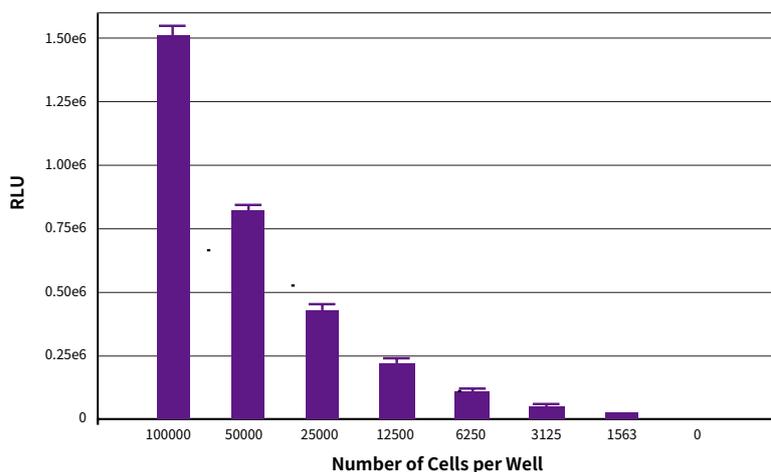


图 1 ViaLight Plus 试剂盒检测结果。梯度稀释 K562 细胞，用 ViaLight Plus 检测试剂盒和 SpectraMax L 化学发光微孔板读板机读板

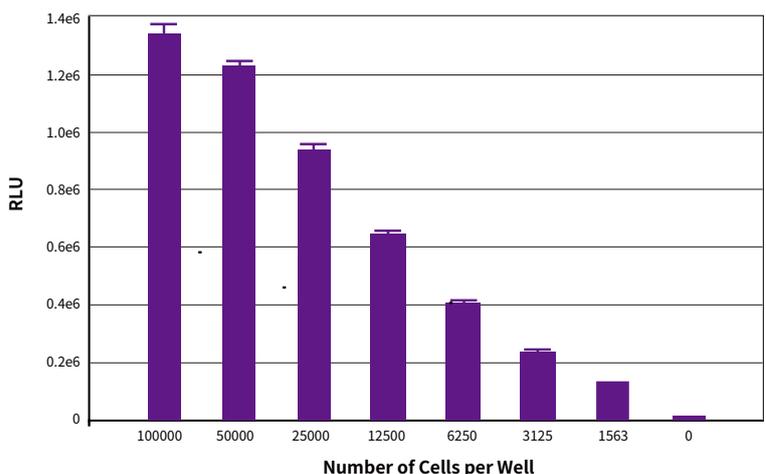


图 2 ToxiLight 检测试剂盒结果。梯度稀释的 K562 细胞释放的 AK 用 ToxiLight 检测试剂盒和 SpectraMax L 化学发光微孔板读板机检测

结论

由用户决定哪种检测方法最适合他们的应用，但是正如本文所示，结合 ViaLight Plus 和 ToxiLight 检测试剂盒检测能够提供更多的信息，这点是用户需要认真考虑的。采用 Molecular Devices 的 SpectraMax L 化学发光微孔板读板机和 SoftMax Pro 软件结合龙沙公司 ViaLight Plus 和 ToxiLight 检测试剂盒，为研究人员提供了一种快速、灵敏的细胞死亡检测方法。高灵敏度和宽检测窗口，确保细胞毒性容易检测到。

Molecular Devices 其他解决方案

SoftMax Pro GxP 能够为用户提供符合 GLP/GMP 合规要求和 FDA 21 CFR Part 11 要求的软件。硬件和软件验证工具能够快速、简便地完成验证过程，使得验证数据采集和分析的合规性更加简便。

参考文献

1. Crouch S, Kozlowski R, Slater K and Fletcher J. (1993). The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. J. Immunol. Meth. 160(1) 81-8.
2. Squirrel D and Murphy J. (1997). Rapid detection of very low numbers of micro-organisms using adenylate kinase as a cell marker. A Practical Guide to Industrial Uses of ATP Luminescence in Rapid Microbiology P107-113.

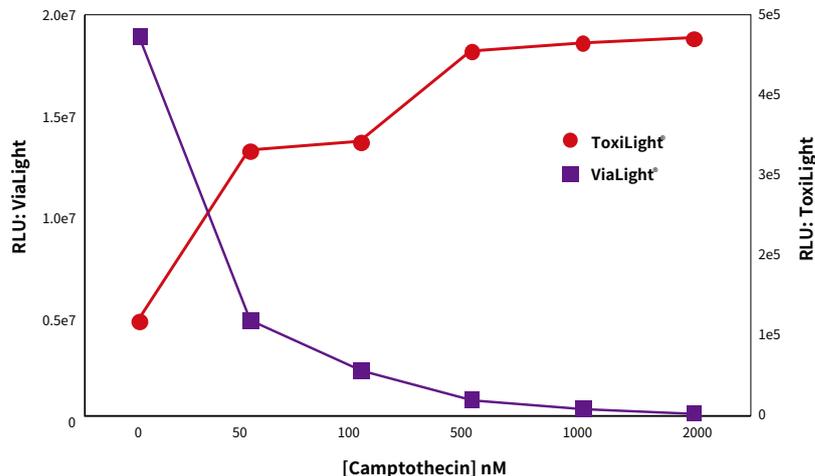


图3 结合 ViaLight Plus 和 ToxiLight 检测试剂盒结果。U937 细胞用浓度增加的喜树碱处理。结合 ViaLight Plus 和 ToxiLight 检测试剂盒在 SpectraMax L 化学发光微孔板读板机上读板

	Unresponsive	Proliferative	Cytostatic	Cytotoxic
ViaLight Plus Assay	RLUs remain constant* →	RLUs increase* ↑	RLUs decrease* ↓	RLUs decrease* ↓
ToxiLight Assay	RLUs remain constant* →	RLUs remain constant* →	RLUs remain constant* →	RLUs increase* ↑

* Compared to untreated control



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

