



Promega

Technical Bulletin

CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay

中文说明书

普洛麦格(北京)生物技术有限公司

地址: 北京市东城区北三环东路 36 号环
球贸易中心 B 座 907-909

电话: 010-58256268

传真: 010-58256160

网址: www.promega.com.cn

用于指导产品 G5421, G5430, G5440, G1111 和 G1112 的使用

Part# CTB169

CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay

此中文说明书可以从以下网址 <http://www.promega.com.cn/ctbs/>

请登陆以上网页查看您是否使用的是最新版的说明书。如果您在使用这个系统时有任何问题，请与 Promega 技术支持联系。邮件: chinatech@promega.com.cn

I. 描述.....	1
II. 产品组分和保存条件.....	4
III. 操作步骤.....	5
A. 一般操作步骤.....	5
B. 应用举例：用B9细胞检测IL-6生物活性的操作程序.....	5
IV. 通常需考虑的因素.....	6
A. 背景吸光度值.....	6
B. 读取数据的可选波长.....	6
C. 淋巴细胞检测.....	7
D. 试剂优化.....	7
E. 细胞数的优化.....	7
V. 相关产品.....	8
VI. 参考文献.....	11

I. 描述

CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay(a)是一种用比色法来检测细胞增殖和细胞毒实验中的活细胞数量的检测试剂。此试剂含有一个新型的四唑化合物 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS(a)] 和一种电子偶联剂(phenazine ethosulfate; PES)。PES具有增强的化学稳定性，这使它可与MTS混合形成稳定的溶液。这种方便的“单溶液”模式，是在第一代CellTiter 96[®] AQueous Assay的基础上的改进，CellTiter 96[®] AQueous Assay中使用的电子偶联剂PMS与MTS溶液是分开提供的。

MTS (Owen's reagent) 被细胞生物还原成为一种有色的甲贲产物，可直接溶解于培养基中(图1, 1)。这种转化很可能是在代谢活跃的细胞中的脱氢酶产生的NADPH或NADH的作用下完成的(2)。检测时，只需将少量的CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent 直接加入培养板孔的培养基中，孵育1–4小时，

然后以酶标仪读取490nm的吸光度值(3,4)。

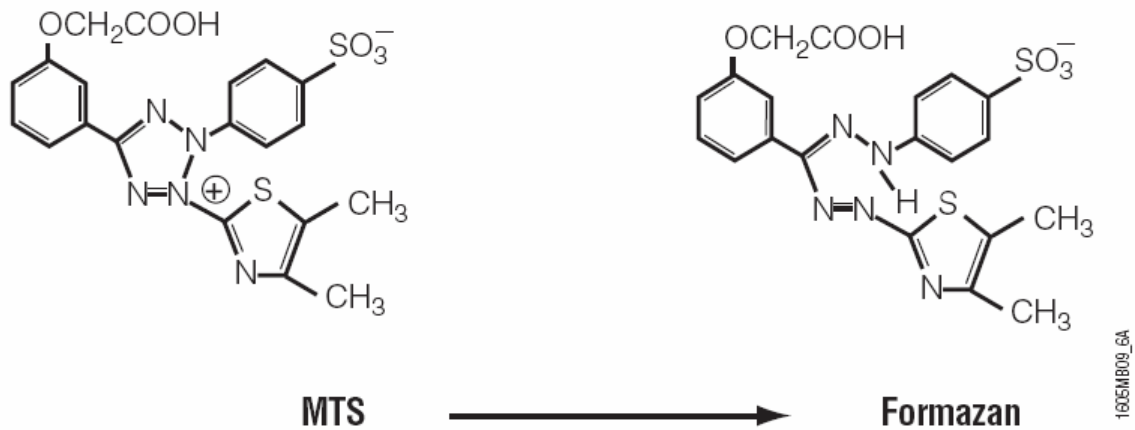


图1. MTS四唑盐和其甲贍产物的结构。

在490nm处检测到的甲贍产物的量与培养中的活细胞数成正比(图2)。由于MTS的甲贍产物在组织培养基中可溶，CellTiter 96[®] AQueous One Solution Assay与MTT或INT法相比操作步骤更少(5,6)。MTT还原反应的甲贍产物是一种结晶沉淀，在检测（570nm）前需要额外的步骤来溶解这种结晶(7)。

如果您目前在使用[³H]胸腺嘧啶掺入法，那么可以在通常需加入放射性胸腺嘧啶的时间点用CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent 来替代[³H]胸腺嘧啶。通过检测数据已证明基于MTS法的CellTiter 96[®] AQueous Assay 和基于MTT法的CellTiter 96[®] Assay能够替代[³H]胸腺嘧啶法(4,7)。

CellTiter 96[®] AQueous One Solution Assay的优点:

- **使用简单:** 把试剂加入到细胞中，孵育，检测。
- **方便:** 过滤灭菌的单一溶液，即用型试剂。
- **快速:** 可直接在96孔板中进行检测，无需洗涤或富集细胞。也去掉了MTT检测过程中必须的溶解步骤。
- **无放射性:** 无需液闪溶液或放射性废物的处理。
- **灵活:** 检测板被检测后可重新进行孵育，以进一步显色。
- **安全:** 无需挥发性有机溶剂来溶解甲贍产物(与MTT不同)。

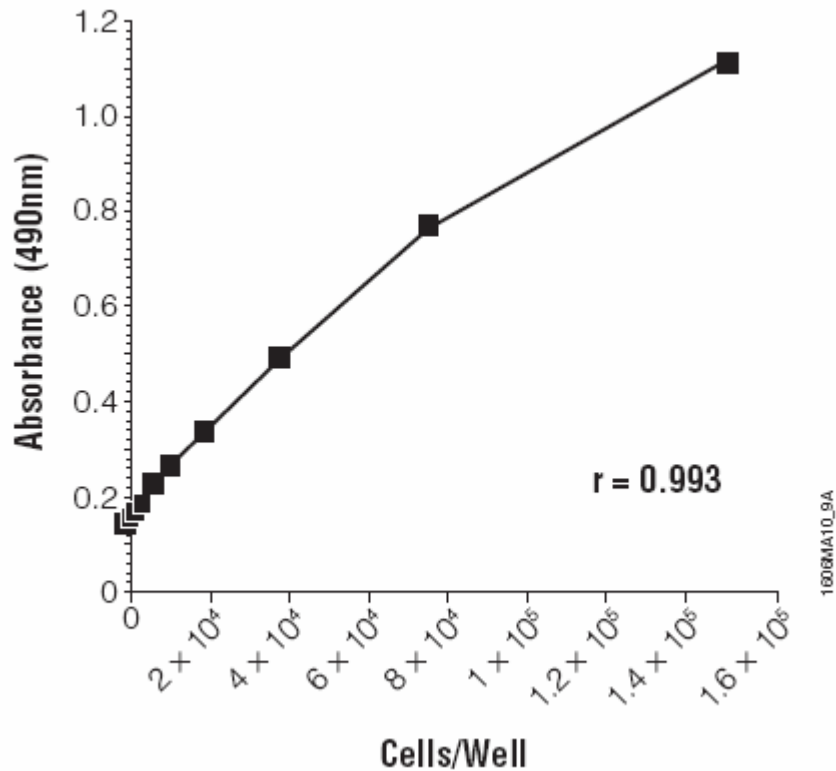


图2. 使用CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Assay在490nm处检测细胞数对吸光值的影响。在加有RPMI的96孔板中加入不同数量的B9杂瘤细胞，RPMI中含有50uM的2-巯基乙醇，5% FBS和2ng/ml IL-6。培养基平衡1小时后,加入20μl/孔CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Reagent。在37°C，5% CO₂浓度的细胞培养箱中孵育1小时,然后使用酶标仪检测490nm 的吸光度值。每个数据点表示4个重复孔的均值±标准差，相关系数为0.993，说明细胞数和吸光度值呈很好的线性相关性。背景吸光度值（对应0细胞/孔）没有从数据中减去。

II. 产品组分和保存条件

产品	规格	3 目录号
CellTiter 96 [®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	200 assays	G3582

只用于实验室研究。包括:

- 4ml CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent
- 1 产品说明书

产品	规格	目录号
CellTiter 96 [®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	1,000 assays	G3580

只用于实验室研究。包括:

- 20ml CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent
- 1 产品说明书

产品	规格	目录号
CellTiter 96 [®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	5,000 assays	G3581

只用于实验室研究。包括:

- 100ml CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent
- 1 产品说明书

储存条件:长期储存,-20°C避光保存。产品有效期请参见产品信息标签。频繁使用,4°C避光保存至6周。

注意: 实验证明此试剂冻融10次后与新鲜的试剂使用效果相同。

安全性: 就我们所知, 此物质的化学、物理和毒理学性质还未完全研究清楚; 因此, 我们建议您在使用的试剂时, 带手套, 穿实验服并带护目镜。

光敏感性: CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent是一种光敏感的试剂, 装在琥珀色的容器中。试剂暴露在光线下数小时后可能会发生褪色。这种褪色反应可能会导致490nm的背景吸光值轻微升高, 但不会影响检测结果。

III 操作步骤

4

用户提供:

- 96孔组织培养板
- 多道加样器（排枪），或连续式加样器，或数字式加样器
- 酶标仪

III.A. 一般操作步骤

1. 融化CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent。室温静止90分钟或37°C 水浴10分钟，应该可以完全溶解20ml的CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent。

2. 在96孔板中，每孔100ul培养基加20ul CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent。

注: 推荐以排枪或连续式加样器及数字式加样器加试剂，以保证加样方便准确。

3. 在37°C，5% CO₂的环境下孵育1-4个小时。

注:如果立刻检测就直接进行第4步，如果需要以后检测，每孔加入25ul 10% SDS终止反应，避光保存于室温的湿盒中，最多可保存18小时。然后再进行第4步。

4. 490nm读取吸光度值。

III.B. 应用举例：用B9细胞检测IL-6 生物活性的操作程序

1. B9细胞在含有5% FBS, 50μM 2-巯基乙醇 (2-ME)和5ng/ml的重组IL-6的培养基中培养，每3天或当细胞浓度达到 2×10^5 cells/ml时，以 2×10^4 细胞/ml的I细胞浓度传代培养细胞，并以IL-6继续处理。

注: 用于生物检测的B9细胞应该在最后一次传代培养后的2天 (以IL-6处理)。

2. 加50μl/孔的IL-6样品或标准品进行检测，以含有5% FBS和50μM 2-ME的RPMI 1640稀释。IL-6的标准液的初始滴定浓度4ng/ml在第12列，进行两倍系列稀释至列2(至4pg/ml)。(在下面的第5步加入细胞悬液后，滴定标准的终浓度将会变为从12列的2ng/ml到第2列的2pg/ml)。使用列1作为阴性对照：加入无IL-6的RPMI 1640培养基(和附加成分)。在37°C，5% CO₂ 的湿箱中平衡平板，同时收集细胞用于实验。

3. 在含有5% FBS和50μM 2-ME的RPMI 1640中离心 $300 \times g$ ，5 min洗两遍细胞。

4. 确定细胞数和细胞活力(通过台盼蓝染色法),以含有5% FBS和50μM 2-ME的RPMI 1640重悬细胞至 1×10^5 细胞/ml的终浓度。

5. 每孔加50μl细胞重悬液(5,000个细胞)至第2步准备好的平板中。现在每孔总体积应为100μl。

6. 将平板在37°C，5% CO₂的细胞培养箱中孵育48–72小时。

7. 每孔加20 μ l CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent。

8. 在37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂的细胞培养箱中孵育1–4小时。

注: 如果立刻检测就直接进行第9步, 如果需要以后检测, 每孔加入25 μ l 10% SDS终止反应, 避光保存于室温的湿盒中, 最多可保存18小时。然后再进行第9步。 **5**

9. 490nm读取吸光度值。

10. 绘制曲线: 经校正的吸光值在Y轴, 生长因子浓度在X轴。确定最大吸光值(峰值)和最小吸光值(无生长因子对照)差值的一半所对应的X轴值; 该值即为ED₅₀值(ED₅₀ = 产生半数最大反应的所必需的生长因子浓度)。

IV. 通常需考虑的因素

IV.A. 背景吸光度

在以 CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent 孵育后, 细胞培养基中会在 490nm 有微量的自发产生的吸收光。使用的细胞培养基种类, 血清种类, pH 和暴露在光线下的时间长度都可能会影响 490nm 的背景吸光度值。孵育 4 小时后, 背景吸光度值通常在 0.2–0.3 吸光单位。背景吸光度可能受某些带四唑还原反应的化合物的影响。强还原物质, 包括维生素 C, 或含巯基的化合物, 如谷胱甘肽, 辅酶 A 和二硫苏糖醇, 能够以非酶的方式还原四唑盐, 从而导致背景吸光值的增加。高 pH 的培养基或长时间暴露在直接光照下面也可能导致自发的四唑盐还原反应的加速进而导致背景吸光值的增加。如果使用含酚红的培养基, 快速的颜色变化可能指示待测化合物引起的 pH 值变化。

待测化合物产生的特异的化学干扰可以通过检测对照孔(含有不同浓度待测化合物的培养基, 但是不含细胞)的吸光度来确定。

490nm的背景吸光度值可用下述方法校正: 准备3个重复的对照孔(无细胞), 含有与实验孔同样体积的细胞培养基和CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent。从所有其它孔的吸光值中减去“无细胞”对照孔在490nm的吸光度平均值, 即可得到校正的吸光度值。

IV.B. 读取数据的可选波长

图3. 显示MTS还原后产生的甲贲产物的吸光度光谱。我们推荐在吸收峰490nm读取数据; 但是如果您的酶标仪没有490nm的滤片, 可以在450–540nm范围内读取数据。如果需要, 可以在其它波长读取吸光度值, 但是检测灵敏度会降低。在630–700nm范围的参考波长可以用来减去细胞碎片过多造成的背景值, 以及其它非特异性吸光度值。

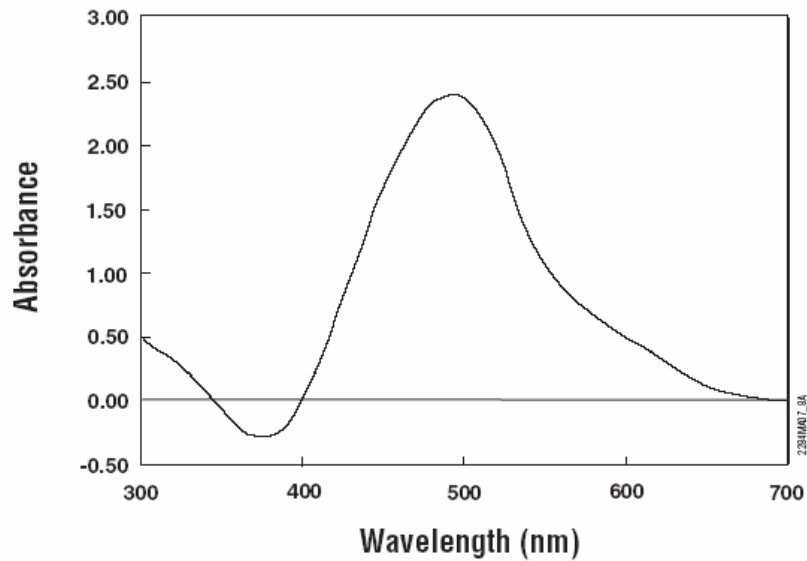


图 3. MTS/甲贍吸光度光谱。MTS四唑化合物还原后产生的甲贍产物的吸光度光谱在490nm显示最大吸光值。负吸光值（382nm）对应的是MTS的消失（转化成甲贍产物）。

IV.C. 淋巴细胞检测

淋巴细胞产生的甲贍比其它类型的细胞要少(8)。为了得到更显著的吸光度值变化，需增加细胞数至约 $2.5-10 \times 10^4$ 细胞/孔，并在加入CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent后孵育培养板至最长的4小时。

IV.D. 试剂优化

四唑盐和电子偶联剂的浓度已经通过多种常用细胞系（100ul培养基，在96孔板中培养）进行了优化。如果使用不同体积的培养基，可以根据20μl 试剂/100μl 培养基的比例调整。这个试剂:培养基比值产生的MTS终浓度为317μg/ml /实验孔。对于不同的细胞系，最适的四唑盐和电子偶联剂的浓度可能会有微小的变化；尽管如此，使用CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent配方的试剂，检测灵敏度很少受到影响。如果试剂优化对你的实验至关重要，我们推荐使用 CellTiter 96[®] AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Cat.# G5421, G5430, G5440)或 CellTiter 96[®] AQueous MTS Reagent Powder (Cat.# G1111, G1112)，这些试剂化合物是分开提供的。

IV.E. 细胞数的优化

细胞增殖研究需要细胞在一段时间内生长。因此应选择合适的起始细胞数使其产生的检测信号接近检测线性范围的低端。这样有助于保证在实验终点检测到的信号不会超过检测的线性范围。可以参考图2的实验来确定细胞数。

不同类型的细胞，代谢活性不同。影响细胞代谢的因素也会影响细胞数和吸光值的关系。黏附依赖性细胞在高细胞密度时会产生接触抑制，进而代谢活性降低，导致细胞数和吸光度值的非线性关系。影响细胞质体积或细胞生理状态的因素也会影响代谢活性。

对大多数肿瘤细胞，杂瘤细胞和纤维母细胞系,推荐5,000 cells/孔作为增殖研究的起始细胞数，虽然少于1,000个细胞通常也可被检测。血淋巴细胞例外，一般需要25,000–250,000细胞/孔才能获得足够的吸光

度值。

V.相关产品

MTS/MTT-Based Cell Viability Assay Systems

Product	Size	Cat.#
CellTiter 96 [®] AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay	1,000 assays	G5421
	5,000 assays	G5430
	50,000 assays	G5440
CellTiter 96 [®] AQueous MTS Reagent Powder*	250mg	G1112
	1g	G1111
CellTiter 96 [®] Non-Radioactive Cell Proliferation Assay	1,000 assays	G4000
	5,000 assays	G4100

For Laboratory Use. *PMS is not supplied with MTS Reagent Powder and must be obtained separately.

Luminescent-Based Cell Viability Assay System

Product	Size	Cat.#
CellTiter-Glo [®] Luminescent Cell Viability Assay	10ml	G7570
	10 × 10ml	G7571
	100ml	G7572
	10 × 100ml	G7573

Resazurin-Based Cell Viability Assay System

Product	Size	Cat.#
CellTiter-Blue [®] Cell Viability Assay	20ml	G8080
	100ml	G8081
	10 × 100ml	G8082

Fluorescent-Based Cell Viability Assay

Product	Size	Cat.#
CellTiter-Fluor [™] Cell Viability Assay	10ml	G6080
	5 × 10ml	G6081
	2 × 50ml	G6082

For Laboratory Use.

Cytotoxicity Assay Systems (LDH)

Product	Size	Cat.#
CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay	200–800 assays	G7890
	1,000–4,000 assays	G7891
CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay*	1,000 assays	G1780
CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay*	10ml	G9290
	5 × 10ml	G9291
	2 × 50ml	G9292

*For Laboratory Use.

Apoptosis Assay Systems

Product	Size	Cat.#
Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay	1ml	G7792
	10ml	G7790
	100ml	G7791
Caspase-Glo® 2 Assay*	10ml	G0940
	50ml	G0941
Caspase-Glo® 6 Assay*	10ml	G0970
	50ml	G0971
Caspase-Glo® 3/7 Assay*	2.5ml	G8090
	10ml	G8091
	100ml	G8092
Caspase-Glo® 8 Assay*	2.5ml	G8200
	10ml	G8201
	100ml	G8202
Caspase-Glo® 9 Assay*	2.5ml	G8210
	10ml	G8211
	100ml	G8212
CaspACE™ Assay System, Colorimetric*	50 assays	G7351
	100 assays	G7220
DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System	60 reactions	G3250
DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System	40 reactions	G7130
	20 reactions	G7360

*For Laboratory Use.

Apoptosis Reagents

Product	Size	Cat.#
CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker	50µl	G7461
	125µl	G7462
Anti-ACTIVE® Caspase-3 pAb	50µl	G7481
Anti-Cytochrome c mAb	100µg	G7421
Anti-pS ⁴⁷³ Akt pAb	40µl	G7441
Anti-PARP p85 Fragment pAb	50µl	G7341
Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK	125µl	G7232
	50µl	G7231
Caspase Inhibitor, Ac-DEVD-CHO	100µl	G5961

Viability and Cytotoxicity Assay

Product	Size	Cat.#
MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay (live/dead cell protease activity determination)	10ml	G9200
	5 × 10ml	G9201
	2 × 50ml	G9202
CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay (dead cell protease activity determination)	10ml	G9260
	5 × 10ml	G9261
	2 × 50ml	G9262
MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay (live/dead cell protease activity determination)	10ml	G9270
	5 × 10ml	G9271
	2 × 50ml	G9272

For Laboratory Use.

VI. 参考文献

1. Barltrop, J.A. *et al.* (1991) 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1**, 611-4.
2. Berridge, M.V. and Tan, A.S. (1993) Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**, 474-82.
3. Cory, A.H. *et al.* (1991) Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun.* **3**, 207-12.
4. Riss, T.L. and Moravec, R.A. (1992) Comparison of MTT, XTT, and a novel tetrazolium compound for MTS for in vitro proliferation and chemosensitivity assays. *Mol. Biol. Cell (Suppl.)* **3**, 184a.
5. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
6. Bernabei, P.A. *et al.* (1989) In vitro chemosensitivity testing of leukemic cells: Development of a semiautomated colorimetric assay. *Hematol. Oncol.* **7**, 243-53.
7. *CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Technical Bulletin #TB112*, Promega Corporation.
8. Chen, C.-H. *et al.* (1990) MTT colorimetric assay detects mitogen responses of spleen but not blood lymphocytes. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **93**, 249-55.

(a) The MTS tetrazolium compound is the subject of U.S. Pat. No. 5,185,450 assigned to the University of South Florida and is licensed exclusively to Promega Corporation.

© 1996-2007 Promega Corporation. All Rights Reserved.

Anti-ACTIVE, Apo-ONE, Caspase-Glo, CellTiter 96, CellTiter-Blue, CellTiter-Glo and CytoTox 96 are registered trademarks of Promega Corporation. CaspACE, CellTiter-Fluor, CytoTox-Fluor, CytoTox-Glo, CytoTox-ONE and DeadEnd are trademarks of Promega Corporation.

Products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations. Please visit our Web site for more information.

NEN is a registered trademark of NEN Life Science Products, Inc.

All prices and specifications are subject to change without prior notice.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.