



Promega

技术手册

CellTox™ Green Cytotoxicity Assay

G8741, G8742, G8743 和 G8731 使用说明

原英文技术手册: #TM375

修订于 08/12

www.promega.com

#CTM375

CellTox™ Green Cytotoxicity Assay

所有技术文献的英文原版均可在 www.promega.com/resources/protocols 获得。请访问该网址以确定您使用的说明书是否为最新版本。如果您在使用该试剂盒时有任何问题，请与 Promega 北京技术服务部联系。

电子邮箱：chinatech@promega.com.cn

1. 产品描述	1
2. 产品组分和储存条件	3
3. 试剂配制及保存	4
3.A. 终点检测、2X 检测试剂-标准配制	4
3.B. 终点检测、5X 检测试剂-多重检测的试剂配制	5
3.C. 快速、“零步”加样-在细胞铺板时加试剂	5
3.D. 快速、“零步”加样-在给药时加试剂	5
4. CELLTOX™ GREEN CYTOTOXICITY ASSAY 验证实验的操作步骤	5
4.A. 确定线性范围和灵敏度，方法 1	6
4.B. 确定线性范围和灵敏度，方法 2	7
5. CELLTOX™ GREEN CYTOTOXICITY ASSAY 的用户操作步骤	9
5.A. 终点检测，2X 检测试剂试验操作	9
5.B. 终点检测，5X 检测试剂的操作步骤	10
5.C. 快速、零步检测-在细胞铺板时加试剂的操作步骤	11
5.D. 快速、零步检测-在给药时加试剂的操作步骤	12
5.E. 基本的、顺序多重检测（与 CELLTITER-GLO® ASSAY 组合）	13
6. 注意事项	14
7. 参考文献	16
8. 相关产品	16

1. 产品描述

常规细胞毒性检测大多基于生物指标（biomarker）的活力，如乳酸脱氢酶-LDH、磷酸甘油醛脱氢酶-GADPH、腺苷酸激酶-Adenylate Kinase、死细胞蛋白酶-Dead Cell Protease 等。生物指标活力具有半衰期，所以当细胞处理时间较长时（如 72 小时），这些检测难以反映真实的细胞毒性。CellTox™ Green Cytotoxicity Assay 采用一种专利的非对称花青荧光染料-CellTox™ Green Dye（1），这种染料不能进入活细胞，所以活细胞荧光无明显变化；但可以进入受损细胞与 DNA 结合，从而使受损细胞荧光获得显著增强（见图 1）。这种荧光染料与受损细胞 DNA 结合而导致的荧光值变化与细胞毒性成比例相关（见图 2）。

CellTox™ Green Dye 对细胞基本上无毒性作用，多种细胞系均能对其很好的耐受。该染料可以用培养基进行稀释，在细胞铺板或给药时加入培养板，实现对细胞毒性的“零步”动态检测（如图 3）。也可以在化合物处理细胞一段时间后，用 Assay Buffer 将染料稀释后加入到细胞中，作为常规终点检测（见图 3）。

CellTox™ Green Cytotoxicity Assay 的另外一个用途是它可以与其它细胞健康检测试剂盒组合，如 CellTiter-Glo®、CellTiter-Fluor™、Caspase-Glo®等，对细胞毒性、细胞活力和细胞凋亡等进行多重检测，以获取关于细胞毒性机制的细胞健康信息。

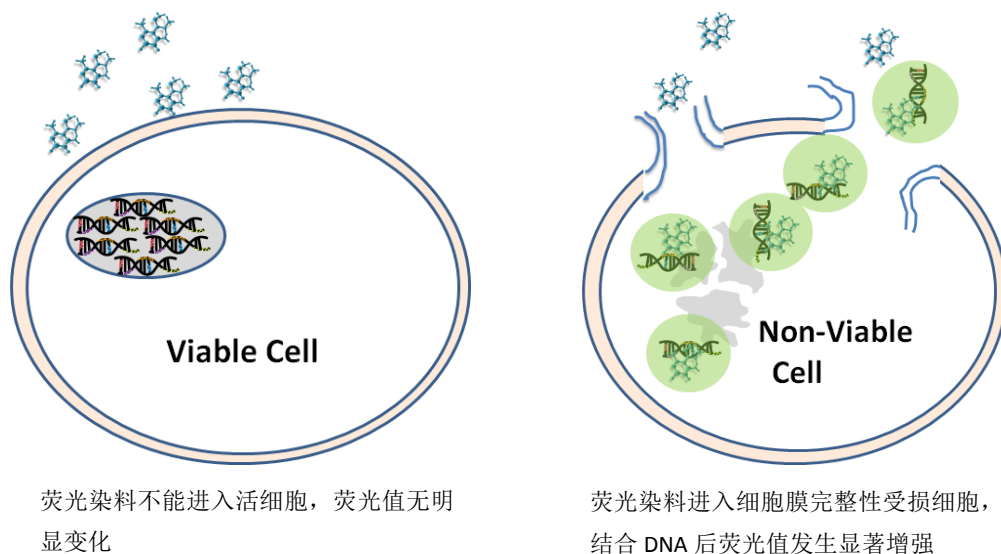


图 1. CellTox™ Green Dye 与细胞膜完整性受损细胞 DNA 结合

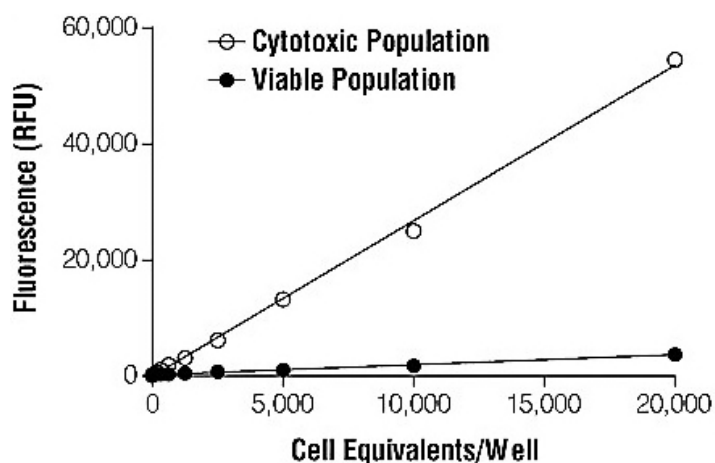


图 2. CellTox™ Green Dye 荧光值与细胞毒性细胞数目成正比

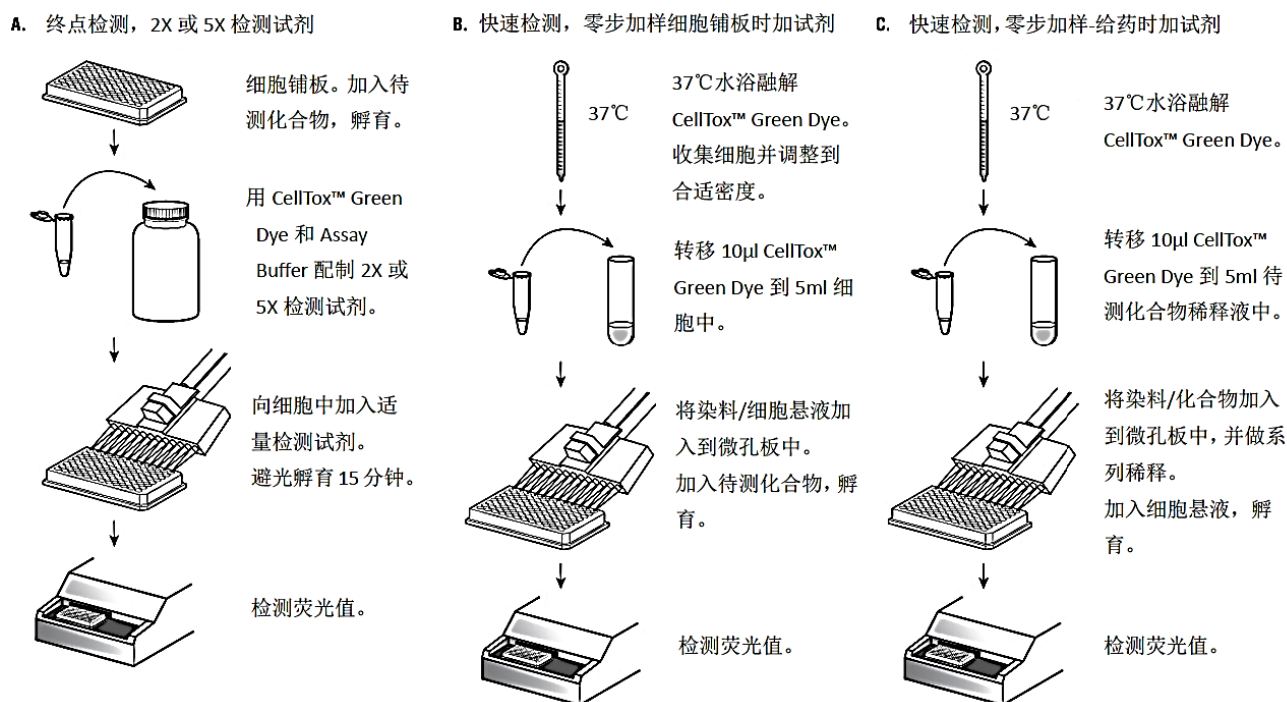


图 3. CellTox™ Green Dye 加样方法示意图

2. 产品组分和储存条件

产品	规格	目录号
CellTox™ Green Cytotoxicity Assay	10ml	G8741

G8741 中含有的试剂足够在 96 孔板中做 100 个检测（每个检测用 100 μ l 试剂）或在 384 孔板中做 400 个检测（每个检测用 25 μ l 试剂）。包括：

- 1 X 20 μ l CellTox™ Green Dye, 1000X
- 1 X 10ml Assay Buffer
- 1 X 0.5ml Lysis Solution

产品	规格	目录号
CellTox™ Green Cytotoxicity Assay	50ml	G8742

G8742 中含有的试剂足够在 96 孔板中做 500 个检测（每个检测用 100 μ l 试剂）或在 384 孔板中做 2000 个检测（每个检测用 25 μ l 试剂）。包括：

- 5 X 20 μ l CellTox™ Green Dye, 1000X
- 1 X 50ml Assay Buffer
- 1 X 0.5ml Lysis Solution

产品	规格	目录号
CellTox™ Green Cytotoxicity Assay	100ml	G8743

G8743 中含有的试剂足够在 96 孔板中做 1000 个检测（每个检测用 100µl 试剂）或在 384 孔板中做 4000 个检测（每个检测用 25µl 试剂）。包括：

- 1 X 200µl CellTox™ Green Dye, 1000X
- 2 X 50ml Assay Buffer
- 1 X 0.5ml Lysis Solution

产品	规格	目录号
CellTox™ Green Express Cytotoxicity Assay	200µl	G8731

G8731 中含有的试剂足够在 96 孔板中做 1000 个检测或在 384 孔板中做 4000 个检测（按照推荐的方式在孔中进行 1:1000 倍稀释）。包括：

- 1 X 200µl CellTox™ Green Dye, 1000X

储存条件： -20℃ 储存。有效期见产品标签。

可单独购买的产品

产品	规格	目录号
Lysis Solution	5 ml	G1821

3. 试剂配制及保存

根据实验需要，CellTox™ Green Cytotoxicity Assay 和 CellTox™ Express Green Cytotoxicity Assay 中的 CellTox™ Green Dye，可采取四种方法配制和加样。在所有方法中，CellTox™ Green Dye 在细胞培养液中的终浓度均为染料原液的 1/1000。2X 检测试剂为终点细胞毒检测的标准配制方法。5X 检测试剂可以配合其它检测试剂进行多重检测。而快速、“零步”加样模式可以对细胞毒性进行动态检测，即在多个时间点检测同一样品的细胞毒性。在动态检测结束后，也可以加入其它检测试剂进行多重检测。

3.A. 终点检测、2X 检测试剂-标准配制

1. 将试剂盒所有组分在 37℃ 水浴中完全融解。涡旋振荡各组分使之充分混匀。将 CellTox™ Green Dye 短暂离心以使液体富集在管底。
2. 转移相应体积 CellTox™ Green Dye 到 Assay Buffer 瓶中，以配制 CellTox™ Green Reagent。G8741 取 20µl，G8743 取 100µl。对于 50ml 规格的 G8742，可根据实验需要的试剂量将 Assay Buffer 转移到一个新管子中，按每 10ml Assay Buffer 加 10µl CellTox™ Green Dye 配制。涡旋振荡配好的试剂使之充分混匀。使用前**避光**。

储存： 建议每次只配制单次实验所需试剂量。所配试剂室温可以保存 24 小时。未用完的

CellTox™ Green Reagent 可在 4°C 保存 7 天而不会有明显性能改变。

3.B. 终点检测、5X 检测试剂-多重检测的试剂配制

1. 将试剂盒所有组分在 37°C 水浴中完全融解。涡旋振荡各组分使之充分混匀。将 CellTox™ Green Dye 短暂离心以使液体富集在管底。
2. 将 Assay Buffer 以 2ml 的倍数规格转移到一个新的离心管中，转移的具体体积根据实验需要确定。每 2ml Assay Buffer 加入 20µl CellTox™ Green Dye。涡旋振荡使之充分混匀。使用前**避光**。
注意: 为避免使用加样槽加样造成的体积损失，可转移 2.2ml Assay Buffer 到 20µl CellTox™ Green Dye 中。由此导致的 buffer 和 dye 比率的改变对检测性能影响很小。

3.C. 快速、“零步”加样-在细胞铺板时加试剂

1. 将 CellTox™ Green Dye 在 37°C 水浴中完全融解。涡旋振荡使其充分混匀。将 CellTox™ Green Dye 短暂离心以使液体富集在管底。
2. 用新鲜培养基收集和调整细胞密度（如每 ml 100,000-200,000 细胞）。每 5ml 细胞加入 10µl CellTox™ Green Dye，颠倒混匀或轻度涡旋振荡以保证均一性。
3. 将染料/细胞混合液加入到无菌微孔板中（96 孔板每孔 50µl，384 孔板每孔 12µl）。

3.D. 快速、“零步”加样-在给药时加试剂

1. 将 CellTox™ Green Dye 在 37°C 水浴中完全融解。涡旋振荡使其充分混匀。将 CellTox™ Green Dye 短暂离心以使液体富集在管底。
2. 每 5ml 化合物稀释培养基中加入 10µl CellTox™ Green Dye，涡旋振荡以保证均一性。
注意: 准备足量的染料/稀释培养基混合液，以保证起始稀释和后续系列稀释之用。
3. 将染料/化合物混合液加入到无菌多孔板中，进行连续稀释（96 孔板每孔 50µl，384 孔板每孔 12µl）。

4. CellTox™ Green Cytotoxicity Assay 验证实验的操作步骤

用户需提供的材料

- 与荧光光度计匹配的壁不透明的 96 孔或 384 孔组织培养板（透明或不透明底）
- 排枪和枪头，或自动化液体分样器
- 具有激发波长 485-510nm，发射波长 520-530nm 滤片或单色光镜的微孔板荧光检测仪
- 涡旋振荡仪和定轨振荡器
- 细胞和培养基
- 水
- 血细胞计数器和台盼蓝

注：如果以前没有在所使用细胞系中做过该检测，建议按 4.A 或 4.B 描述的方法确定该细胞系的线性范围和灵敏度。

4.A. 确定线性范围和灵敏度，方法 1

注：该方法为终点检测，2X 检测试剂而写，但测试结果也可用于其它三种配制方法，因为无论用哪种试剂配制方法，CytoTox™ Green Dye 在培养细胞中的终浓度是一样的。

1. 收集贴壁细胞（如胰酶消化），用新鲜培养基洗涤和重悬细胞。
注：悬浮细胞直接从步骤 2 开始。
2. 使用血细胞计数器和台盼蓝对活细胞进行计数，在离心管中用至少 4ml 新鲜培养基调整细胞密度到每毫升 200,000 活细胞。
注：如果细胞密度小于每毫升 200,000 活细胞，需要对细胞进行离心浓缩。活细胞比例小于 95% 会增加背景值，降低检测的信噪比。
3. 将步骤 2 中的细胞取 2ml 分别加到两个离心管中，一管作为“细胞毒性对照”，另一管作为“细胞活性对照”。
4. 将 80µl Lysis Solution 加入 2ml 细胞毒性对照细胞管中，将 80µl 水加到细胞活性对照细胞管中，轻轻涡旋振荡混匀。
5. 取 100µl 新鲜培养基，加到壁不透明的 96 孔板的第 2-12 列。
6. 将 100µl 细胞毒性对照样品加到 1-2 列 A-D 排，将 100µl 细胞活性对照样品加到 1-2 列 E-H 排。从第 2 列开始，吹打混匀后转移 100µl 样品到第 3 列，同样吹打混匀后从第 3 列转移 100µl 样品到第 4 列，依次稀释到第 11 列。将第 11 列中样品混匀后吸出 100µl 并丢弃（见表 1）。

表 1. 确定线性范围和灵敏度方法 1 的 96 孔板布局

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	20,000	10,000	5,000	2,500	1,250	625	312	156	78	39	19	NC
B	20,000	10,000	5,000	2,500	1,250	625	312	56	78	39	19	NC
C	20,000	10,000	5,000	2,500	1,250	625	312	56	78	39	19	NC
D	20,000	10,000	5,000	2,500	1,250	625	312	56	78	39	19	NC
E	20,000	10,000	5,000	2,500	1,250	625	312	56	78	39	19	NC
F	20,000	10,000	5,000	2,500	1,250	625	312	56	78	39	19	NC
G	20,000	10,000	5,000	2,500	1,250	625	312	56	78	39	19	NC
H	20,000	10,000	5,000	2,500	1,250	625	312	56	78	39	19	NC

橘黄色区域（A-D 排）为细胞毒性细胞；灰色区域（E-H 排）为活细胞。 NC：无细胞对照

7. 配制 2X 检测试剂，方法见 3.A 部分。
8. 加 100µl 2X 检测试剂到所有孔中，振荡混匀（500-700rpm）。
9. 室温避光孵育至少 15 分钟，以促进 DNA 和染料结合。
注：孵育时间延长不会对实验产生不利影响，但也未必能明显增加荧光值。

由于不同厂家仪器制造工艺和检测参数不同，检测荧光值前在定轨振荡器上振荡 1 分钟（700-900rpm）可使实验孔间重复性更好。

10. 检测荧光值。激发波长选择 485-500nm，发射波长选择 520-530nm。调整光电倍增管以优化线性范围。

注：应避免检测信号达到饱和值和仪器检测极限，因为这可能会影响检测的线性范围。当信号饱和时，有些仪器读数会显示“over”或“####”，提示信号已饱和；其他仪器会给出默认最大值，暗示信号已经饱和。而默认重复孔读数应该都一样。如果发生信号饱和，可降低光电倍增管增益（gain）。

11. 计算细胞毒性细胞复孔和活细胞复孔荧光读数的平均值，用细胞毒性细胞荧光值减去活细胞荧光值。以净荧光值与细胞数做图，进行线性拟合。若线性相关系数>0.95，可认为有较好的线性关系。如果线性相关系数<0.95，去除最大细胞数荧光均值，直到线性相关系数>0.95。所得数据即为试剂盒在测试细胞系中的线性范围。
12. 通过计算每一个细胞稀释度（如 20,000 个细胞/孔；10,000 个细胞/孔；5000 个细胞/孔，等等）的信噪比，可获得所用细胞系的实际灵敏度。计算公式为：

$$\text{细胞毒性信噪比 S:N} = \frac{\text{细胞毒性细胞组荧光均值} - \text{活细胞组荧光均值}}{\text{无细胞对照的标准差}}$$

注：检测实际灵敏度是信噪比要大于 3 个标准差（Zhang, et al. 1999; 2）。

4.B. 确定线性范围和灵敏度，方法 2

注：该方法为终点检测，2X 检测试剂而写，但测试结果也可用于其它三种配制方法，因为无论用哪种试剂配制方法，CytoTox™ Green Dye 在培养细胞中的终浓度是一样的。

1. 收集贴壁细胞（如胰酶消化），用新鲜培养基洗涤和重悬细胞。
注：悬浮细胞直接从步骤 2 开始。
2. 使用血细胞计数器和台盼蓝对活细胞进行计数，在合适规格离心管中用至少 20ml 培养基调整细胞密度到每毫升 100,000 活细胞。
注：如果细胞密度小于每毫升 100,000 活细胞，需要对细胞进行离心浓缩。活细胞比例小于 95%会增加背景值，降低检测的信噪比。
3. 将步骤 2 中的细胞等分到两个离心管中，一管作为“细胞毒性对照”，另一管作为“细胞活性对照”。将一管进行“温和”超声处理（具体程度根据超声后的细胞形态检查而定），使细胞膜破裂，模拟 100%死亡细胞（即细胞毒性对照）。另一管未处理的细胞为具最大活力的细胞群（即细胞活性对照）。
4. 在 1.5ml 离心管中按不同比例做一系列的细胞毒性细胞群和细胞活力细胞群混合液（见表 2）。

表 2. 细胞毒性细胞群和细胞活性对照细胞群按不同比例混合

细胞毒性百分比	细胞毒性细胞群体积	细胞活性细胞群体积
100	1,000µl	0µl
98	980µl	20µl
95	950µl	50µl
90	900µl	100µl
75	750µl	250µl
50	500µl	500µl
25	250µl	750µl
10	100µl	900µl
5	50µl	950µl
2	20µl	980µl
0	0µl	1,000µl

5. 将上述细胞混合液轻柔涡旋振荡混匀后，取 100µl 细胞混合液到 96 孔板 8 个重复孔中，第一列为 100%细胞毒性细胞，第 2 列为 98%细胞毒性细胞，依次加入。第 12 列加入培养基，作为无细胞对照（见表 3）。

表 3. 确定线性范围和灵敏度方法 2 的 96 孔板布局

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100%	98%	95%	90%	75%	50%	25%	10%	5%	2%	0%	NC
B	100%	98%	95%	90%	75%	50%	25%	10%	5%	2%	0%	NC
C	100%	98%	95%	90%	75%	50%	25%	10%	5%	2%	0%	NC
D	100%	98%	95%	90%	75%	50%	25%	10%	5%	2%	0%	NC
E	100%	98%	95%	90%	75%	50%	25%	10%	5%	2%	0%	NC
F	100%	98%	95%	90%	75%	50%	25%	10%	5%	2%	0%	NC
G	100%	98%	95%	90%	75%	50%	25%	10%	5%	2%	0%	NC
H	100%	98%	95%	90%	75%	50%	25%	10%	5%	2%	0%	NC

6. 准备 2X 检测试剂，方法见 3.A 部分。
7. 加 100µl 2X 检测试剂到所有孔中，在定轨振荡器上短暂振荡混匀（500-700rpm）。
8. 室温避光孵育至少 15 分钟，以促进 DNA 和染料结合。
注：孵育时间延长不会对实验产生不利影响，但也未必能明显增加荧光值。
 由于不同厂家仪器制造工艺和检测参数不同，检测荧光值前在定轨振荡器上振荡 1 分钟（700-900rpm）可使实验孔间重复性更好。
9. 检测荧光值。激发波长选择 485-500nm，发射波长选择 520-530nm。调整光电倍增管以优化线性范围。

注：应避免检测信号达到饱和值和仪器检测极限，因为这可能会影响检测的线性范围。当信号饱和时，有些仪器读数会显示“over”或“####”，提示信号已饱和；其他仪器会给出默认最大值，暗示信号已经饱和。而默认重复孔读数应该都一样。如果发生信号饱和，可降低光电倍增管增益（gain）。

10. 计算细胞毒性细胞复孔荧光读数的平均值。减去无细胞对照复孔的荧光均值。以净荧光值与细胞数做图，进行线性拟合。若线性相关系数 >0.95 ，可认为有较好的线性关系。如果线性相关系数 <0.95 ，去除最大细胞数荧光均值，直到线性相关系数 >0.95 。所得数据即为试剂盒在待测细胞系中的线性范围。图 4 为检测结果：

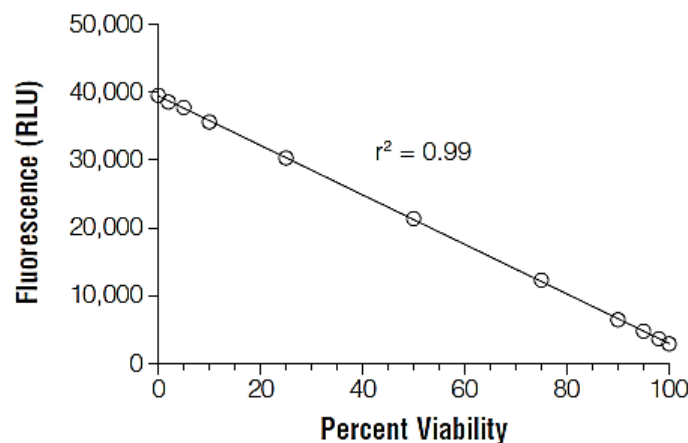


图 4. 检测的线性范围。活的与死的 K562 细胞按照不同比例混合，模拟细胞毒性导致的 0-100% 的细胞活性范围。CellTox™ GreenReagent 产生的荧光随细胞毒性升高而升高，在每孔 10,000 细胞密度下，可以鉴别 98%和 100%细胞活性差别。

5. CellTox™ Green Cytotoxicity Assay 的用户操作步骤

用户需提供的材料

- 与荧光光度计匹配的壁不透明的 96 孔或 384 孔组织培养板（透明或不透明底）
- 排枪和枪头，或自动化液体分样器
- 加样槽
- 具有激发波长 485-510nm，发射波长 520-530nm 滤片或单色光镜的微孔板荧光检测仪
- 涡旋振荡仪和定轨振荡器
- 细胞和培养基
- 水
- 血细胞计数器和台盼蓝

5.A. 终点检测，2X 检测试剂试验操作

1. 调整细胞至合适浓度后加入不透明微孔板中（例如：在 96 孔板加入 50 μ l 浓度为每毫升 100,000-200,000 的细胞，相当于每孔 5000-10,000 个细胞）。第 11 和 12 列分别设置细胞毒阳性对照、活细胞阴性对照和无细胞背景对照。

注：不透明白板和黑板都可使用，使用黑板信噪比更好。

2. 培养一段时间使贴壁细胞贴壁（悬浮细胞可直接进行第 3 步）。

3. 加入系列稀释的化合物（如 96 孔板加入 50 μ l）。第 11-12 列只加入同等体积的溶剂。

注：原发性坏死对照（可选）：将 Lysis Solution 以 1:25 的比例加入细胞毒阳性对照复孔中（每 100 μ l 细胞加 4 μ l 到第 11 列 A-D 排）。该对照在增殖的细胞中终点检测时的信号代表最小阳性对照信号，在非增殖细胞中代表最大死细胞对照信号。活细胞阴性对照（未处理细胞群）终点检测时的信号代表最大的阴性对照信号。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	化 1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	阳性	背景
B	化 1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	阳性	背景
C	化 1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	阳性	背景
D	化 1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	阳性	背景
E	化 2	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	阴性	背景
F	化 2	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	阴性	背景
G	化 2	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	阴性	背景
H	化 2	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	阴性	背景

4. 孵育一段时间（如 24、48、72 小时）。

5. 配制 2X 检测试剂，方法见 3.A 部分。

6. 每孔加入 100 μ l 的 CellTox™ Green Reagent。

7. 在定轨振荡器上振荡 1 分钟（500-700rpm），以保证细胞和试剂混合均匀。

8. 室温避光孵育至少 15 分钟，以促进 DNA 和染料的结合。

注：孵育时间延长不会对实验产生不利影响，但也未必能明显增加荧光值。由于不同厂家仪器制造工艺和检测参数不同，读数前在定轨振荡器上振荡 1 分钟（700-900rpm）可使实验孔间重复性更好。

9. 检测荧光。激发波长选择 485-500nm，发射波长选择 520-530nm。

注：应避免检测信号达到饱和值和仪器检测极限，因为这可能会影响检测的线性范围。当信号饱和时，有些仪器读数会显示“over”或“####”，提示信号已保护；其他仪器会给出默认最大值，暗示信号已经饱和。而默认重复孔读数应该都一样。如果发生信号饱和，可降低光电倍增管增益（gain）。

5.B. 终点检测，5X 检测试剂的操作步骤

1. 调整细胞至合适浓度后加入不透明微孔板中（例如：在 96 孔板加入 50 μ l 浓度为每毫升 100,000-200,000 的细胞，相当于每孔 5000-10,000 个细胞）。第 11-12 列设置细胞毒阳性对照、活细胞阴性对照和无细胞背景对照。
注：不透明白板和黑板都可使用，使用黑板信噪比更好。
2. 培养一段时间使贴壁细胞贴壁（悬浮细胞可直接进行第 3 步）。
3. 加入系列稀释的化合物（96 孔板加入 50 μ l）。第 11-12 列只加入同等体积的溶剂（见表 4）。
注：原发性坏死对照（可选）：将 Lysis Solution 以 1:25 的比例加入细胞毒阳性对照复孔中（每 100 μ l 细胞加 4 μ l 到第 11 列 A-D 排，见表 4）。该对照在增殖的细胞中终点检测时的信号代表最小阳性对照信号，在非增殖细胞中代表最大死细胞对照信号。活细胞阴性对照（未处理细胞群）终点检测时的信号代表最大的阴性对照信号。
4. 孵育一段时间（如 24、48、72 小时）。
5. 配制 5X 检测试剂，方法见 3.B 部分。
6. 每孔加入 20 μ l 的 CellTox™ Green Reagent。
7. 在定轨振荡器上振荡混匀 1 分钟（500-700rpm），以保证细胞和试剂混合均匀。
8. 室温避光孵育至少 15 分钟，以促进 DNA 和染料的结合。
注：孵育时间延长不会对实验产生不利影响，但也未必能明显增加荧光值。
由于不同厂家仪器制造工艺和检测参数不同，读数前在定轨振荡器上振荡 1 分钟（700-900rpm）可使实验孔间重复性更好。
9. 检测荧光。激发波长选择 485-500nm，发射波长选择 520-530nm。
注：应避免检测信号达到饱和值和仪器检测极限，因为这可能会影响检测的线性范围。当信号饱和时，有些仪器读数会显示“over”或“####”，提示信号已饱和；其他仪器会给出默认最大值，暗示信号已经饱和。而默认重复孔读数应该都一样。如果发生信号饱和，可降低光电倍增管增益（gain）。
10. 按 5.E 部分进行顺序多重检测。

5.C. 快速、零步检测-在细胞铺板时加试剂的操作步骤

1. 将 CellTox™ Green Dye 在 37 $^{\circ}$ C 水浴中完全融解。涡旋振荡使其充分混匀。将 CellTox™ Green Dye 短暂离心以使液体富集在管底。
2. 用新鲜培养基收集和调整细胞至合适密度（如每 ml 100,000-200,000 细胞）。每 5ml 细胞加入 10 μ l CellTox™ Green Dye，颠倒混匀或轻度涡旋振荡以保证染料的均一性。
3. 将染料/细胞混合液加入到无菌微孔板中（96 孔板每孔 50 μ l，384 孔板每孔 12 μ l）。
注：不透明白板和黑板都可使用，使用黑板信噪比更好。
4. 培养一段时间使贴壁细胞贴壁（悬浮细胞可直接进行第 5 步）。
5. 加入系列稀释的待测化合物（96 孔板加入 50 μ l，384 孔板加入 12 μ l）。第 11-12 列只加入同等体积的溶剂。
注：原发性坏死对照（可选）：将 Lysis Solution 以 1:25 的比例加入细胞毒阳性对照复孔中（每 100 μ l 细胞加 4 μ l 到第 11 列 A-D 排）。该对照在增殖的细胞中终点检测时的信号代表最小阳性

对照信号，在非增殖细胞中代表最大死细胞对照信号。活细胞阴性对照（未处理细胞群）终点检测时的信号代表最大的阴性对照信号。

由于不同厂家仪器制造工艺和检测参数不同，读数前在定轨振荡器上振荡 1 分钟(700-900rpm)可使实验孔间重复性更好。

表 5. 零步检测-在细胞铺板时加试剂的 96 孔板布局

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	化 1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	阳性	背景
B	化 1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	阳性	背景
C	化 1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	阳性	背景
D	化 1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	阳性	背景
E	化 2	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	阴性	背景
F	化 2	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	阴性	背景
G	化 2	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	阴性	背景
H	化 2	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	阴性	背景

- 在 0-72 小时任一时间点检测荧光值。每次检测后将培养板放回培养箱。
- 按 5.E 部分进行顺序多重检测。

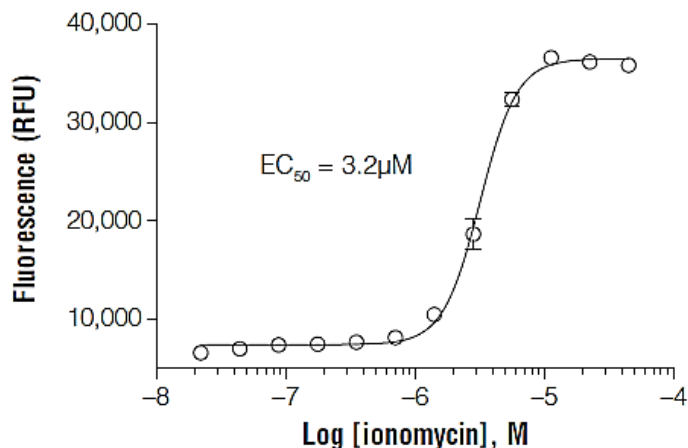


图 5. 典型的剂量效应曲线。细胞系为 K562，处理药物 Ionomycin，处理时间 4 小时。操作时遵循快速、零步检测-在细胞铺板时加试剂的操作步骤。

5.D. 快速、零步检测-在给药时加试剂的操作步骤

- 将 CellTox™ Green Dye 在 37°C 水浴中完全融解。涡旋振荡使其充分混匀。将 CellTox™ Green Dye 短暂离心以使液体富集在管底。
- 每 5ml 化合物稀释液加入 10μl CellTox™ Green Dye，涡旋振荡以保证均一性。
注意：准备足量的染料/化合物混合液，以保证起始稀释和后续系列稀释之用。
- 将染料/化合物混合液加入到无菌多孔板中，进行系列稀释（96 孔板每孔 50μl，384 孔板每孔 12μl）。

4. 将细胞加入到无菌多孔板中（96 孔板每孔 50 μ l，384 孔板每孔 12 μ l）。

注：原发性坏死对照（可选）：将 Lysis Solution 以 1:25 的比例加入细胞毒性阳性对照复孔中（每 100 μ l 细胞加 4 μ l 到第 11 列 A-D 排）。该对照在增殖的细胞中终点检测时的信号代表最小阳性对照信号，在非增殖细胞中代表最大死细胞对照信号。活细胞阴性对照（未处理细胞群）终点检测时的信号代表最大的阴性对照信号。

由于不同厂家仪器制造工艺和检测参数不同，读数前在定轨振荡器上振荡 1 分钟（700-900rpm）可使实验孔间重复性更好。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	化 1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	阳性	背景
B	化 1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	阳性	背景
C	化 1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	阳性	背景
D	化 1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	阳性	背景
E	化 2	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	阴性	背景
F	化 2	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	阴性	背景
G	化 2	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	阴性	背景
H	化 2	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	阴性	背景

5. 在 0-72 小时任一时间点检测荧光值。每次检测后将培养板放回培养箱。

6. 按 5.E 部分进行顺序多重检测。

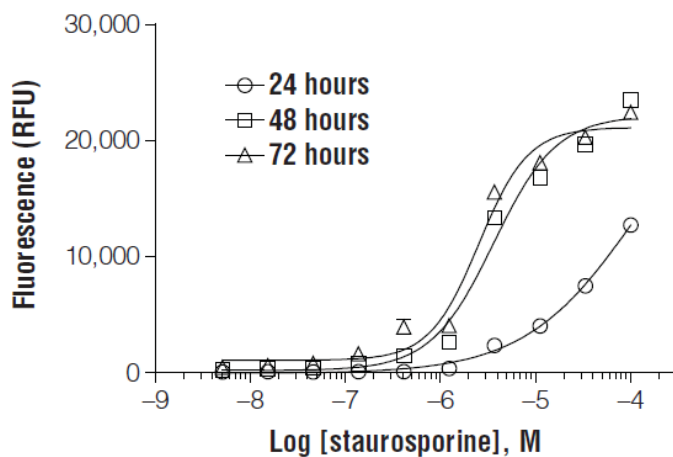


图 6. 细胞毒性依赖于剂量和处理时间。细胞系为 K562，处理药物为 Staurosporine，处理时间 24、48、72 小时。操作时遵循快速、零步检测-在细胞铺板时加试剂的操作步骤。

5.E. 基本的、顺序多重检测（与 CellTiter-Glo® Assay 组合）

注：CellTox™ Green Cytotoxicity Assay 可与多种互补的或交叉的细胞健康检测试剂组合进行多重检测，以从每孔细胞中获取更多的细胞健康信息。绝大多数情况下，可以按照各自的标准的等量添加操

作方法进行。本方法使用 CellTiter-Glo® Assay 作为多重检测的应用例子。部分可供多重检测的细胞健康相关的试剂盒在第 6 部分有列举。

1. 在最终完成 CellTox™ Green 的荧光检测后，将板子平衡到室温。
2. 将 CellTiter-Glo® Assay Buffer 在 37°C 水浴中完全融解。之后取出 CellTiter-Glo® Assay Buffer，使其平衡至室温。
3. 将 CellTiter-Glo® Assay Buffer 瓶中的所有液体加入 CellTiter-Glo® Substrate 瓶中。颠倒混匀或者轻轻涡旋振荡混匀以保证试剂的均一性。
4. 将 CellTiter-Glo® Assay Reagent（第 3 步中配好的试剂）加到含有 CellTox™ Green Dye 及处理过的细胞的板子中（96 孔板每孔加 100µl，384 孔板每孔加 25µl）。
5. 在定轨振荡器上振荡板子（500-700rpm）以促进细胞裂解和 ATP 抽提。
6. 5-10 分钟后检测发光（luminescence）。

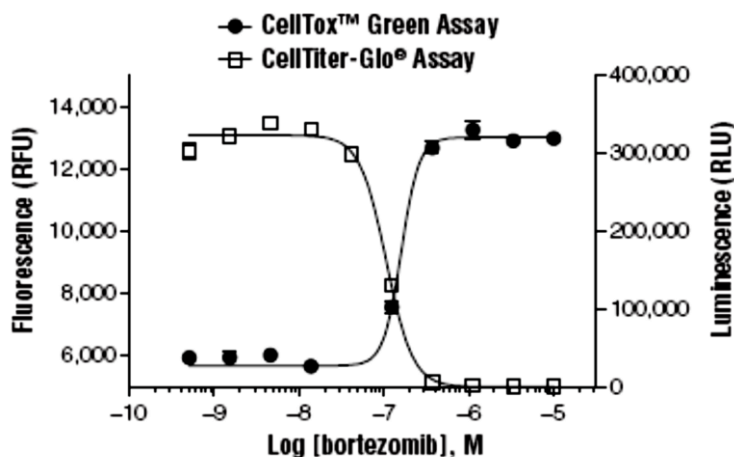


图 7. 多重检测可以对细胞健康进行互补的测量。对 K562 细胞用 bortezomib 处理 48 小时后，加入 CellTox™ Green Reagent。先检测与细胞毒性相关的荧光，然后加入 CellTiter-Glo® Reagent，检测与细胞活力相关的发光。从这种相反的测量中得到的 EC₅₀ 值是相似的。

6. 注意事项

干扰因素

CellTox™ Green Cytotoxicity Assay 的检测原理是基于荧光染料与细胞膜完整性受损细胞 DNA 的结合，因此不会受其它基于酶活性的常规细胞毒性检测干扰因素的影响。但一些可插入 DNA 的抗癌化合物，如阿霉素 (Doxorubicin)、放线菌素 (Antinomycin)、柔红霉素 (Daunorubicin) 等，可竞争性结合 DNA，降低 CellTox™ Green Dye 与 DNA 的结合，导致细胞毒性被低估。

该检测也受常规荧光检测干扰因素的影响，如化合物自发荧光和荧光淬灭。虽然根据统计 CellTox™ Green

Dye 激发和发射光谱内自发荧光干扰因素非常少，但也可通过比较化合物刚加入（孵育之前）和终点检测时的数据来确定自发荧光干扰。另外，淬灭效应可通过加入化合物或溶剂和 CellTox™ Green Dye 到非处理组或 Lysis Solution 处理组细胞中，进而比较两组荧光值大小来确定。

荧光测量

CellTox™ Green Dye 最佳激发波长为 512nm，发射波长为 532nm。可使用 GloMAX® Multi+ 仪器自带的蓝色滤光片检测。其它基于滤光片的仪器，应选择 FITC 或罗丹明 110(R110) 滤光片，对应激发波长 $485\pm 20\text{nm}$ ，发射波长 $520\pm 20\text{nm}$ 。该参数也可用于基于单色光镜的仪器，但最佳光栅大小需要通过实验决定。

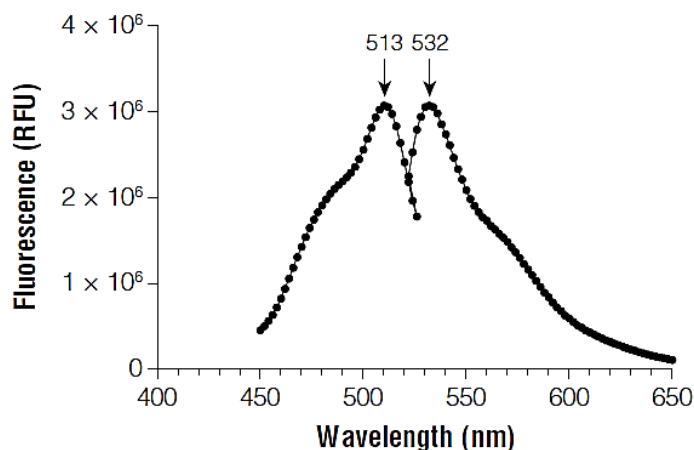


图 8. CellTox™ Green Dye 的光谱，显示激发和发射峰

荧光值也受孔体积的影响，因此要对孔体积进行归一化。当培养时间较长时，如大于 24 小时，培养基会蒸发（即使在湿度培养箱中），培养板外侧孔与内侧孔会形成体积梯度。为降低这种效应，可在最外侧孔中多加些培养基（最多可加到 300 μl ，不要用这些孔做细胞毒性检测）。

培养条件

细胞长时间培养，如 >24 小时，会导致代谢废物积累、pH 值改变和营养成分匮乏，进而对细胞产生毒性，而这种毒性与化合物处理无关。由培养条件导致的细胞膜完整性损伤，同样会使 CellTox™ Green Dye 与受损细胞 DNA 结合。因此，尽量优化培养条件和体积，以确保检测到的细胞毒性是化合物依赖型的。同样，如果培养细胞的初始活性较低，也会导致非处理组细胞较高的背景值。尽量在每个实验孔中加入相等数量的活细胞。

血清

为了维持细胞的健康和活力一般都需要在培养基中加入血清。高浓度血清 (>20%) 可能会降低 CellTox™ Green Cytotoxicity Assay 的荧光绝对值，但应该不会影响信噪比。一般而言，5-10% 的血清可以满足细胞健康需要而又不会对检测效果有明显影响。

酚红和试剂加入方式

绝大部分商品化培养基中都含有作为 pH 指示剂的酚红。培养基中酚红固有的颜色可以降低整体的荧光值。不同配方的培养基淬灭能力不同，需要在验证实验中测定。终点检测使用 Assay Buffer 配制检测试剂再加入细胞中，可降低荧光淬灭程度，提高信噪比。但 Assay Buffer 不能在快速“零步”加样动态检测中使用。

白色微孔板与黑色微孔板

白板和黑板都可以用于 CellTox™ Green Cytotoxicity Assay 检测。但因白板有更强的自发荧光，故黑板信噪比一般会比白板高 2-25 倍。因此，当使用需要更少细胞的高通量模式（如 384 孔板或 1536 孔板）时，务必使用黑板检测。如果只做 CellTox™ Green Cytotoxicity Assay 检测，使用黑板效果最好。如果与发光检测组合进行多重检测，白板更合适。

可选择的细胞健康多重检测

CellTox™ Green Cytotoxicity Assay 可方便的与多种细胞健康检测试剂盒进行多重检测。列表如下：

第一步检测	第二步检测
CellTox™ Green Cytotoxicity Assay	CellTiter-Blue® Assay (活力)
	CellTiter-Fluor™ Assay (活力)
	CellTiter-Glo® Assay (活力)
	GSH/GSSG-Glo™ Assay (毒性机制)
	Caspase-Glo® 3/7 Assay (毒性机制)
	P450-Glo™ Assay (毒性机制)

7. 参考文献

1. Mc Dougall *et al.* Nucleic Acid Binding Dyes and Uses Therefor US Patent Application 2010/0233710 A1
2. Zhang, J.H., Chung, T.D. and Oldenburg, K.R. (1999) A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Scr.* **4**, 67–73.

8. 相关产品

细胞活力和细胞毒性多重检测试剂盒

产品	规格	目录号
MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay	10ml	G9270
MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay	10ml	G9200

细胞活力和细胞毒性机制研究试剂盒

产品	规格	目录号
ApoTox-Glo™ Triplex Assay	10ml	G6320
ApoLive-Glo™ Multiplex Assay	10ml	G6410

细胞活性检测试剂盒

产品	规格	目录号
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	10ml	G7570
CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay	10ml	G6080
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	20ml	G8080

细胞毒性检测试剂盒

产品	规格	目录号
CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay	10ml	G9290
CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay	10ml	G9260

细胞凋亡检测试剂盒

产品	规格	目录号
Caspase-Glo® 2 Assay	10ml	G0940
Caspase-Glo® 3/7 Assay	10ml	G8091
Caspase-Glo® 6 Assay	10ml	G0970
Caspase-Glo® 8 Assay	10ml	G8201
Caspase-Glo® 9 Assay	10ml	G8211
Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay	10ml	G7790

氧化应激检测试剂盒

产品	规格	目录号
GSH-Glo™ Glutathione Assay	10ml	V6911
GSH/GSSG-Glo™ Assay	10ml	V6611

细胞色素 P450 检测试剂盒

产品	规格	目录号
P450-Glo™ CYP3A4 Assay with Luciferin-IPA	10ml	V9001
P450-Glo™ CYP2C9 Assay	10ml	V8791
P450-Glo™ CYP3A4 Assay (Luciferin-PFBE) Cell-Based/Biochemical Assay	10ml	V8901

检测仪器

产品	规格	目录号
GloMax®-Multi+ Detection System with Instinct™ Software: Base Instrument with Shaking	1 each	E8032