

RealTime-Glo™ & CytoTox-Fluor™ multiplex assay

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS G9711, G9712, G9713, G9260, G9261 AND G9262

1. 細胞培養表面処理済みの 96well 黒クリアボトムプレートもしくはソリッドプレートに任意の細胞数で 50uL ずつ播種する。
また、バックグラウンドとして、細胞を含まない培地だけの well も準備する。
2. 翌日、下記の表を参考に RealTime-Glo™ とテスト化合物を含む培地を調製する。

Component	volume	x サンプル数	= 合計
培地, 2x テスト化合物	49.8 µL		
MT Cell Viability Substrate	0.1 µL		
NanoLuc® Enzyme	0.1 µL		
Final volume per sample	50 µL		

3. 50uL の RealTime-Glo™ 試薬とテスト化合物を含む培地を細胞に添加する。
4. 37°C インキュベーターにて、10 分以上培養する。
5. 任意のタイムポイントにて、発光測定する (72 時間まで繰り返し測定可能)。
6. RealTime-Glo™ の発光測定終了後、培養プレートを 37°C インキュベーターに戻しておく。
7. CytoTox-Fluor™ 試薬を調製する：
8. bis-AAF-R110 Substrate と Assay Buffer を 37°C に温める。
9. Assay Buffer 1mL に bis-AAF-R110 Substrate を全量加え、ゆっくりと混ぜ、Substrate Mix を溶かす。
10. 20uL の CytoTox-Fluor™ 試薬を細胞に添加し、プレートシェーカー等で 1 分間、穏やかに攪拌する。
11. 37°C インキュベーターで 30 分間インキュベートする。
12. 蛍光測定：excitation 485nm/emission 520nm の条件で蛍光を測定する。

(その他の情報)

- RealTime-Glo™ は細胞の種類により、細胞数の測定範囲が異なります。
このため、RealTime-Glo™ のマニュアルを参考に、あらかじめ予備実験を行い、測定できる細胞数を決定してください。
- ステップ 1 で細胞を 100uL ずつ播種し、ステップ 2 の前に培地を 50uL 除去することも可能です。

この Quick Protocol は TM431、TB350 を基に作成された簡易型のプロトコルです。
最新、詳細なプロトコルについては www.promega.com/protocols/ をご覧ください。