

CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay

日本語プロトコール No. TB245J

2000年8月作製

カタログ番号G3580, G3581, G3582.

目次

I. はじめに	1
II. 製品構成	3
III. プロトコール	4
A. 一般的なプロトコール	4
B. B9 cells を使った IL-6 のバイオアッセイに関するプロトコール	4
IV. 一般的な考察事項	5
A. バックグラウンドの吸光度	5
B. データを記録するために最適な波長	5
C. リンパ球でのアッセイ	6
D. 試薬の最適化	6
V. 関連製品の紹介	7
VI. 参考文献	8
VII. 簡易プロトコール	9

I. はじめに

CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay^(a)では、細胞増殖または細胞毒性試験における生細胞数を測定するために比色法を用いています。CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagentには、新しいテトラゾリウム化合物[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS^(a)]と電子輸送試薬 (phenazine ethosulfate; PES) が含まれます。PESは化学的な安定性が高められているので、MTSと混合して、安定的な溶液を調整できません。従来のCellTiter 96[®] AQueous Assayでは、電子輸送試薬としてPMS(phenazine methosulfate)を使用し、PMS溶液とMTS溶液が別々になっていました。本製品はこの従来品を改良した便利な“One Solution”タイプです。

MTSテトラゾリウム化合物(Owen's試薬)は細胞によって生物的に還元され、組織培養液に可溶性発色性のホルマジン産物へと変換されます(図1; 1)。この変換は、代謝活性がある細胞のデヒドロゲナーゼによって産生されるNADPHまたはNADHによって行われると考えられています(2)。アッセイは少量のCellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagentを培養ウェルに直接加え、1~4時間インキュベートし、96ウェルプレートリーダーを用いて490nmの吸光度を測定することで行います(3,4)。

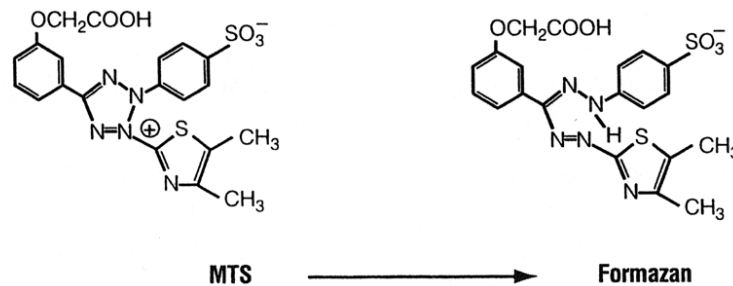


図1. MTS テトラゾリウム塩とそのホルマザン産物

490nmの吸光度として表されるホルマザン産物の量は、培養液に含まれる生細胞数と直接的に比例します(図2)。MTSのホルマザン産物は組織培養液に可溶性を示すので、CellTiter 96® AQueous One Solution AssayではMTTやINTのようなテトラゾリウム化合物を用いた操作よりも少ない手順で済みます(5,6)。MTTを還元したホルマザン産物は結晶化した沈殿を生じ、570nmで吸光度測定を行う前に結晶を溶解するための手順が必要です(7)。

現在、³H-チミジンの取り込み試験を利用しているならば、RI標識した³H-チミジンを適用するステップで、CellTiter 96® AQueous One Solution Reagentの添加を³H-チミジンの適用に置き換えることができます。かつて行われたMTS法のCellTiter 96® AQueous Assayや従来のMTT法のCellTiter 96® Assayと³H-チミジンと比較したバイオアッセイのデータにより、テトラゾリウム試薬と³H-チミジンの取り込みとの置き換えが可能であると示されました(4,7)。

CellTiter 96® AQueous One Solution Assayの特長：

- **使いやすさ：** 細胞にCellTiter 96® AQueous One Solutionを加え、インキュベーション後に吸光度を測定するだけ。
- **簡便性：** 濾過滅菌した調製済み試薬のため、アッセイプレートに加えるだけ。
- **迅速性：** 96ウェルプレートでの細胞の洗浄や回収が不要。また、MTT試験で必要だった可溶化操作も不要。
- **RI不要：** シンチレーションカクテルやRIの廃棄が不要。
- **順応性：** 測定後のプレートでさらに発色を促進するためにインキュベーターに戻すことができます。
- **安全性：** ホルマザン産物を可溶化するための揮発性有機溶媒が不要。

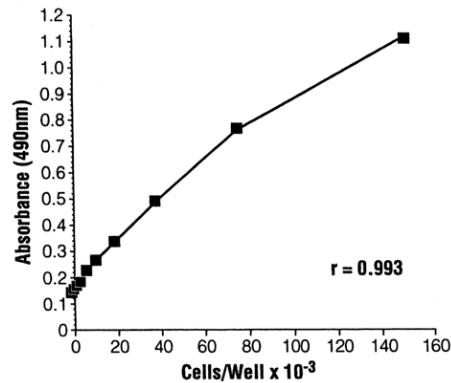


図 2. CellTiter 96® AQueous One Solution Assay を使って測定された細胞数の 490nm の吸光度における影響。さまざまな細胞数の B9 ハイブリドーマ細胞を 50µM 2-mercaptoethanol、5% FBS、2ng/ml IL-6 を含む RPMI の入った 96 ウェルプレートに加えた。1 時間の平衡化を行った後、1 ウェルあたり 20µl の CellTiter 96® AQueous One Solution 試薬を加えた。37 °C に設定した 5% CO₂ を含む湿式インキュベーターに 1 時間おいた後、490nm の吸光度を ELISA プレートリーダーにより測定した。それぞれのポイントは 4 回実験を行った結果の平均値 ± 標準偏差を表します。直線相関係数は 0.993 で、細胞数と 490nm の吸光度の間で直線性があることが示されました。ウェルあたりの細胞数が 0 の時に示されたバックグラウンドの吸光度はこれらのデータから差し引かれていません。

II. 製品構成

製品名	サイズ	カタログ番号
CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	200 回分	G3582
<ul style="list-style-type: none"> ・ 4ml CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent ・ 1 プロトコール 		
製品名	サイズ	カタログ番号
CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	1,000 回分	G3580
<ul style="list-style-type: none"> ・ 20ml CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent ・ 1 プロトコール 		
製品名	サイズ	カタログ番号
CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	5,000 回分	G3581
<ul style="list-style-type: none"> ・ 100ml CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent ・ 1 プロトコール 		

保存条件：長期保存する場合、CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent を遮光し、-20 °C で凍結保存してください。凍結した状態では少なくとも 6 ヶ月間安定です。頻繁に使われる場合には、遮光し 4 °C で保存してください。この場合、6 週間まで安定です。

安全性：私たちの知る限りでは、本製品の化学的および物理学的特性や毒性について完全に解明されていません。そのため、本製品および必要な化学物質を用いる時には手袋、白衣、防護メガネの着用をお勧めします。

光感受性：CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent は光に感受性を示すため、遮光容器にて供給されます。溶液を数時間露光させた場合、変色する可能性があります。この変色は 490nm の吸光度において若干のバックグラウンドとなりますが、CellTiter 96® AQueous One Solution Assay の性能に影響するものではありません。

注意：10 回の凍結/融解を行った CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent は、調製直後のものと同等の性能を示しました。

III. プロトコール

準備するもの

- ・ 組織培養用 96 ウェルプレート
- ・ マルチチャンネルピペット
- ・ 96 ウェルプレートリーダー

A. 一般的なプロトコール

1. CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent を融解する。20ml のボトルで完全に融解するためには、室温で実験台の上に 90 分間置くか、37 °C の恒温水槽に 10 分間浸す。
2. 100µl の培養培地中にサンプルの細胞を含む 96 ウェルアッセイプレートの各ウェルに 20µl の CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent を加える。
3. プレートを 37 °C に設定した 5% CO₂ を含む湿式インキュベーターで 1~4 時間インキュベートする。
注意：細胞の還元作用によって MTS から生成された可溶性ホルマザンの量を測定するには、すぐにステップ 4 に進んでください。すぐに行なわない場合、反応を停止するために各ウェルに 25µl の 10% SDS を加えてください。SDS で処理したプレートは遮光して室温に設定した湿式チャンバーで 18 時間まで保管できます。ステップ 4 に進んでください。
4. 96 ウェルプレートリーダーを使って 490nm の吸光度を測定する。

B. B9 細胞を使った IL-6 のバイオアッセイのプロトコール

1. 5ng/ml ヒト組換え型 IL-6 (カタログ番号 G5541) を加えた RPMI 1640 培地 (5% FBS および 50µM 2-mercaptoethanol(2-ME) を含む) に B9 細胞のストックを培養する。2 × 10⁴/ml までストック培養液を培養し、その後は 3 日ごとまたは細胞密度が 2 × 10⁵/ml に達した時にヒト組換え型 IL-6 を与える。
2. RPMI1640 培地 (5% FBS と 50µM 2-ME を含む) で希釈した IL-6 サンプルまたは IL-6 スタンダードを 50µl/ウェルで加える。ここでは 4ng/ml の IL-6 スタンダードをカラム 12 に 100µl 加え、カラム 2 (4pg/ml) まで 2 倍段階希釈を行い、各ウェルが 50µl の段階希釈された IL-6 を含むようにする (ステップ 5 で細胞が加えられた後、希釈した IL-6 スタンダードの最終濃度はカラム 12 で 2ng/ml、カラム 2 で 2pg/ml となります)。カラム 1 は IL-6 を含まない RPMI 1640 培地のみを陰性コントロールとして使う。準備したプレートを 37 °C に設定した 5% CO₂ を含む湿式インキュベーターで平衡化する。その間にアッセイに使う細胞を回収する。
3. 300 × g、5 分間の遠心により RPMI 1640 (5% FBS と 50µM 2-ME を含む) で B9 細胞を 2 回洗浄する。
4. 細胞数の測定とトリパンブルー色素排除試験を行い、最終濃度 1 × 10⁵/ml となるように RPMI 1640 (5% FBS と 50µM 2-ME を含む) に再溶解する。
5. ステップ 2 で準備したプレートのすべてのウェルに 50µl の細胞浮遊液 (5,000 cells) を分注する。各ウェルの総液量は 100µl となる。
6. 37 °C に設定した 5% CO₂ を含む湿式インキュベーターで 48~72 時間プレートをインキュベートする。

注意：簡易プロトコールが巻末に添付されています。

注意：CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent を 96 ウェルプレートに均等に分注するために、リピーティングピペット、デジタルピペット、マルチチャンネルピペットなどを使用することをお勧めします。

注意：バイオアッセイに用いる B9 cells は、サブカルチャー (IL-6 添加後 2 日経ったストック) でなければなりません。

7. 1ウェルあたり20 μ lのCellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagentを加える。
8. 37 に設定した5% CO₂を含む湿式インキュベーターで1~4時間プレートをインキュベートする。
注意：細胞の還元作用によってMTSから生成された可溶性ホルマザンの量を測定するには、すぐにステップ9を行ってください。すぐに行わない場合、反応を停止するために25 μ lの10% SDSを各ウェルに加えてください。SDSを加えたプレートは室温に設定した湿式チャンパーに遮光した状態で18時間まで保管できます。
9. 96ウェルプレートリーダーを使って490nmの吸光度を記録する。
10. 補正した490nmの吸光度(Y軸)を成長因子の濃度(X軸)に対してプロットする。最大(プラトー)と最小(成長因子を含まないコントロール)の吸光度の中間点に対応するX軸の値を決定し、これをED₅₀の値とする。
(ED₅₀ = 最大値の半分の反応を与えるために必要とされる成長因子の濃度)

IV. 一般的な考察事項

A. バックグラウンドの吸光度

CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagentとインキュベートされた培養培地では微量の自然発生的な490nmの吸光度が生じます。使われる培養培地の種類、血清の種類、pHおよび露光時間の長さは、バックグラウンドの490nmの吸光度に影響するかもしれません。4時間のインキュベーション後、バックグラウンドの490nmの吸光度は一般的には0.2~0.3です。バックグラウンドの490nmの吸光度は以下のように補正できます。

実験に用いたウェルと同様に同量の培地とCellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagentを含んだコントロールのウェルを3ウェル分準備してください。補正した吸光度を得るために“細胞を含まない”ウェルから得られた490nmの吸光度の平均値をその他のウェルの吸光度から引いてください。

B. データを記録するために最適な波長

図3にMTSを還元した結果生じるホルマザンの吸光スペクトラを示します。プロメガでは、吸光のピークを示す490nmを用いたデータの記録を推奨します。しかし、研究室の96ウェルプレートリーダーに490nmのフィルターがない場合、データは450~540nmの間の波長で記録することができます。必要ならば、それ以外の波長で吸光度を記録することもできますが、感度は低下します。過剰の細胞残渣、指紋、その他の非特異的な吸光度によるバックグラウンドを低減させるためには、630~700nmのリファレンス波長を使うと良いでしょう。

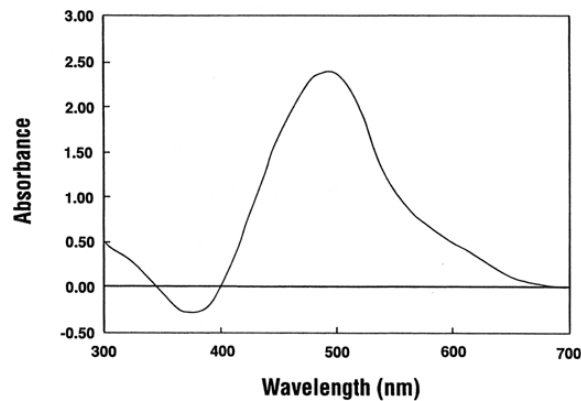


図 3. MTS/ホルマザンの吸光スペクトラ。 MTS テトラゾリウム化合物の還元により生じるホルマザン産物の吸光スペクトラは490nmで最大の吸光度を示します。陰性の吸光度の値 (382nm) は、ホルマザンに変換された MTS の消失に対応します。

C. リンパ球のアッセイ

リンパ球はその他の細胞種よりも少量のホルマザンしか生産しない可能性があります (8)。リンパ球で顕著な吸光度の変化を得るために、1 ウェルあたり約 10^5 まで細胞数を増やし、CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent の添加後、4 時間ずっとインキュベートしてください。

D. 試薬の最適化

テトラゾリウムと電子輸送試薬の濃度は、96 ウェルプレートで 100 μ l の培養液に含まれるさまざまな細胞種で一般的に使えるように最適化されています。もし、違った量の培養液を使う場合には、100 μ l の培養液に対して 20 μ l CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent を加える比率を維持するように調整してください。この試薬と培養液の比率により、1 ウェルあたり 317 μ g/ml MTS の最終濃度となります。テトラゾリウムと電子輸送試薬の最適な濃度における微少な差異が細胞の種類により生じます。しかし、CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent のフォーミュラ (調合) でアッセイ感度が影響を受けることはほとんどありません。アッセイ手順において試薬の最適化が重要である場合、テトラゾリウムと電子輸送試薬が別々に梱包されている CellTiter 96[®] AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (カタログ番号 G5421, G5430, G5440) やテトラゾリウム単品である CellTiter 96[®] AQueous MTS Reagent Powder (カタログ番号 G1111, G1112) をご利用ください。

V. 関連製品の紹介

MTS 法を用いた細胞増殖 / 細胞毒性試験キット

製品名	サイズ	カタログ番号
CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay ^(a)	1,000 回分	G5421
	5,000 回分	G5430
	50,000 回分	G5440
CellTiter 96® AQueous MTS Reagent Powder ^{(a)*}	250mg	G1112
	1g	G1111

* 本製品に PMS は含まれません。別途購入が必要です。

MTT 法を用いた細胞増殖試験キット

製品名	サイズ	カタログ番号
CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay	1,000 回分	G4000
	5,000 回分	G4100

細胞を介した細胞毒性試験キット

製品名	サイズ	カタログ番号
CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	1,000 回分	G1780

アポトーシス試験キット

製品名	サイズ	カタログ番号
Apoptosis Detection System, Fluorescein	60 回分	G3250
DeadEnd™ Colorimetric Apoptosis Detection System	40 回分	G7130
CaspACE™ Assay System, Fluorometric	160 回分	G3540
CaspACE™ Assay System, Colorimetric	50 回分	G7351
	100 回分	G7220

アポトーシス試薬

製品名	サイズ	カタログ番号
CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker	50µl	G7461
	125µl	G7462
Anti-Cytochrome C mAb	100µg	G7421
Anti-pS ⁴⁷³ Akt pAb	40µl	G7441
Anti-PARP p85 Fragment pAb ^(b)	50µl	G7341

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 a cell-viability indicators. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **1**, 611.
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.
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.
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 assay. *Hematol. Oncol.* **7**, 243.
6. Bernabei, P.A. *et al.* (1989) In vitro chemosensitivity testing of leukemic cells: development of a semiautomated colorimetric assay. *Hematol. Oncol.* **7**, 243.
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.

(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.

(b) Patent Pending.

© 1996–2000 Promega Corporation. All Rights Reserved.

CellTiter 96 and CytoTox 96 are trademarks of Promega Corporation and are registered with the U.S. Patent and Trademark Office. CaspACE and DeadEnd are trademarks of Promega Corporation.

VII. 簡易プロトコール

この簡易プロトコールは、CellTiter 96® AQueousに習熟したユーザーが簡単に流れを追えるように意図して作製されました。初めてCellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assayをお使いになる時には、詳細なプロトコール(本紙のセクションIII)にしたがってください。

一般的なプロトコール (セクション III.A)

1. CellTiter 96® AQueous One Solution Reagentを室温または37 °Cで融解する。
2. 100µlの培地中にサンプルを含む96ウェルアッセイプレートの各ウェルに20µlづつ加える。
3. 37 °Cの5% CO₂インキュベーターで1~4時間インキュベートする。
4. 96ウェルプレートリーダーを使って490nmの吸光度を測定する。

B9細胞を使ったIL-6のバイオアッセイのプロトコール (セクション III.B)

1. セクションIII.B.に記載されているようにサブカルチャーにより使用するB9細胞を調整する。
 2. 50µl/ウェルのIL-6サンプルまたはIL-6スタンダードを各列のカラム12に入れる。カラム12からカラム2にかけて2倍段階希釈を行う。カラム1は陰性コントロールとして使う。
 3. RPMI 1640培地(5% FBSと50µM 2-MEを含む)でB9 cellsを2回洗浄する。300 × gで5分間遠心する。
 4. B9 cellsを1 × 10⁵/mlとなるように再浮遊させる。
 5. 96ウェルプレートの各ウェルに50µlの細胞を加える。
 6. 37 °Cに設定した5% CO₂を含む湿式インキュベーターで48~72時間プレートをインキュベートする。
 7. 各ウェルに20µlのCellTiter 96® AQueous One Solution Reagentを加える。
 8. 37 °Cに設定した5% CO₂を含む湿式インキュベーターで1~4時間プレートをインキュベートする。
 9. 96ウェルプレートリーダーを使って490nmの吸光度を測定・記録する。
 10. 補正した490nmの吸光度(Y軸)を成長因子の濃度(X軸)に対してプロットする。ED₅₀値を求める。
-