

Cytotoxic Fluoro test *Wako*

This test provides a simple protocol and the necessary reagents to measure viability of cells treated with various cytotoxic substrates. It is based on fluorometric assay on cell lysis and screening (FACLS). Proliferation and aging of cells can also be estimated by this procedure. The test, which consisted of a unique fluorescent dye, a cell lysis reagent, utilizes properties of the fluorescent dye that differentiates between intact cells and damaged cells, and reacts with DNA to become fluorescent. The dye permeates only damaged or dead cell membrane, and reacts with DNA in the cells. The intensity of fluorescence emissions of the DNA-dye complex before and after addition of the cell lysis reagent to the cell sample represents quantities of damaged cells and total cells applied to the assay, respectively. The procedure is applicable to adhesive cells as well as floating cells.

The followings are fields to be applicable;

- Cytotoxicity assays
- Apoptosis and necrosis, determination of ratio of dead cells and living cells
- Cell proliferation and aging

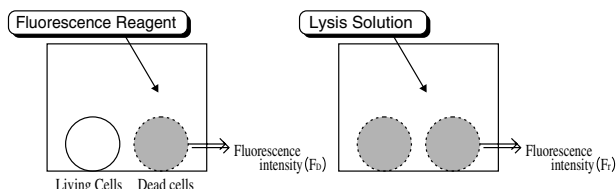
[Characteristics]

1. Determination of viability of cells by percentage of intact and / or living cells per total cells due to unique properties of the dye
2. A simple 2-step procedure, performed in about 5 minutes, applicable to simultaneous screening assay for many samples
3. Cell pre-treatments such as washing of cells, exchange of media, and cell separation by centrifugation are not necessary. Difficult preparation of dye solution like MTT and XTT are avoided.
4. Sensitive and accurate measurement based on cell membrane permeability and the DNA-affinity of the unique fluorescent dye, avoiding interference with changes of pH by addition of drug, temperature, reaction time and serum containing in culture medium, all of which are inevitably associated with use of enzyme reaction in the other assays.
5. No hazardous wastes are generated from use, disuse of RI, toxic organic solvent, or dye.

[Principle of the test]

The fluorescence reagent has unique properties. The dye emits intense fluorescence at 100-1,000 times of the original intensity only when the dye binds to DNA. In addition, the dye enters into cells with damaged cell membranes or dead cells, but not intact or living cells. Thus, fluorescence emission of damaged and dead cells can be measured by staining their DNA with the dye. In the assay system, therefore, one can estimate.

- 1) Damaged cell number by measuring fluorescence intensity [F_D] generated after addition of the dye to the cell sample.
- 2) The number of total cells in the assay by measuring fluorescence intensity [F_T] after subsequent addition of the cell lysis reagent to the sample to disrupt membrane permeability of intact cells.
- 3) The number of intact or living cells by the fluorescence intensity resulting from subtracting [F_D] from [F_T].
- 4) Viability of the cell sample expressed by the percentage of intact cells per total cells.



[Contents]

Fluorescence Reagent	500 μ L	1 vial
Lysis Solution	10 mL	1 vial

※ It is highly recommended to use a known quantity of the reagent.
(Example : Fluorescence Reagent 50 μ L/100 assays)

[Storage] Store at -20°C

[Materials and apparatuses to be used]

1. Materials
 - Culture medium
 - Cells used to be Distilled assayed
 - Distilled water
2. Apparatuses
 - Multiplate reader, Infinite Series (Tecan, Austria)
 - Microdispensors and microtipes
 - Blood cell counter slide glasses
 - Cell culture dishes

[Procedures]

<Setting of Fluorescence/Absorbance multiplate reader in the case of Infinite Series, Tecan Austria>

- (1) Turn on the reader and personal computer connected to the reader. Open the software i-Control regulating the reader system.
- (2) Set assay conditions on the board as follows.

Road Mode	: fluorescence
Excitation	: 420 nm
Emission	: 460 nm
Read	: Top
Shake	: linear, high, 120 sec
Gain	: optimal
Delay Time	: 10
Lag Time	: 0
Integration Time	: 40
Flash Time	: 100

<Preparation of working fluorescence solution>

Add 50 μ L of Fluorescence Reagent to a vial containing 950 μ L diluent with distilled water, and vortex well. Storing on ice until use.

<Assay>

- (1) Dispense 200 μ L of the culture medium to be assayed after culture or treatment of drug to each of well and add 10 μ L of fluorescence working solution.
- (2) Set the plate to fluorescence microplate reader and measure the fluorescence intensity.
- (3) Draw the plate from the reader and add 10 μ L of Lysis Solution to each of the well assayed, gently mixing the suspension by finger tapping.
- (4) Measure the fluorescence intensity.

[Making the standard curve]

<Preparation of cell suspension>

- (1) Collect cells from the culture dish at late log phase of growth and transfer them to a 50mL-centrifuge tube.

- (2) Centrifuge the tube at 1,500 r.p.m. for 5 minutes at room temperature to precipitate the cells, and then carefully remove the supernate from the tube.
- (3) Suspend the cell pellet in 10 mL culture medium by repeats of gentle pipetting several times.
- (4) Repeat (2) followed by (3) with the cell suspension.
- (5) Count cell number of 10 μ L of the cell suspension using blood cell counter slide glass and calculate cell density (cells/mL) of the suspension.
- (6) Adjust cell density of the suspension by diluting the suspension with the culture medium to the desired cell density, such as 5×10^4 to 4×10^4 cells/mL. Usually, 3 mL of cell suspension is needed per plate.

<Dispensing dilution series of cell>

- (1) Flash airduster to the microplate for fluorescence measurement to remove the dust.
- (2) While gently agitating the cell suspension described in the above to distribute cells uniformly, dispense 400 μ L of the cell suspension to 6 wells coded as B11 to G11 in the plate, as shown in figure 1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A											400 μ L	
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Fig. 1

- (3) Dispense 200 μ L of the culture medium to each of the wells coded as B2-G10. for dilution, as shown in figure 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		200 μ L/well										
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Fig. 2

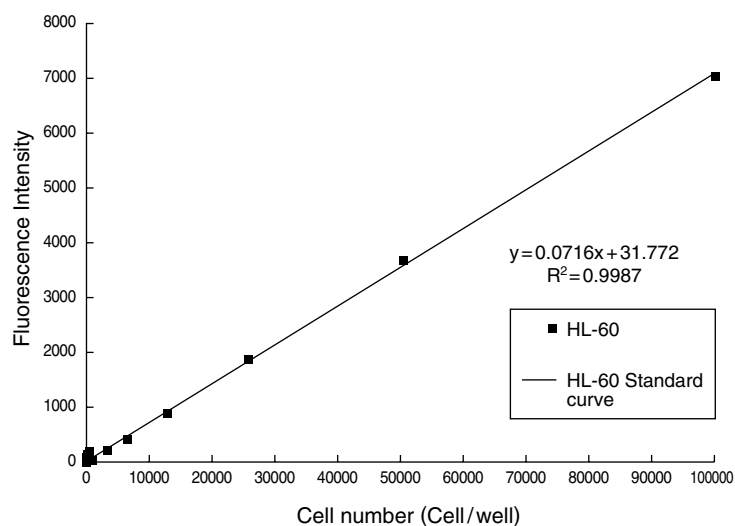
- (4) Transfer 200 μ L of the cell suspension in the wells to adjacent wells coded as B10-G10.
- (5) Continue the dilution as described in (4) until the wells coded as B4-G4., and then remove 200 μ L of the last diluted suspensions in B4-G4 wells, which contain 400 μ L. The dilution series contains 8 density of cells, and the culture medium in the residual wells are for blanks, as shown in figure 3.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	cells	0	0	78.13	156.3	312.5	625	1250	2500	5000	10000	
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Fig. 3

<Measurement>

- (1) Add 10 μ L of fluorescence working solution to each of the wells to be assayed, and lightly tap the side of the microplate to distribute the dye uniformly.
- (2) Set the plate on the microplate reader and measure the fluorescence intensity.
- (3) Remove the plate from the reader and add 10 μ L of Lysis Solution to each of the wells to be assayed, gently mixing the suspension by tapping the side of the microplate.
- (4) Measure the fluorescence intensity.



FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
Telephone : + 81-6-6203-3741
Facsimile : + 81-6-6201-5964
<http://fwk.fujifilm.co.jp>

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation

1600 Bellwood Road
Richmond, VA 23237
U.S.A.
Telephone : + 1-804-271-7677
Facsimile : + 1-804-271-7791
<http://www.wakousa.com>

FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH

Fuggerstrasse 12
D-41468 Neuss
Germany
Telephone : + 49-2131-3111-0
Facsimile : + 49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>

コード No. 293-55001 (1,000 回用)

細胞毒性測定用

細胞毒性フルオロテストワコー (FACLS 法)

使用説明書

【はじめに】

本試薬は、Fluorometric Assay based on Cell Lysis & Staining method (FACLS 法)を用いた、死細胞、全細胞数及び細胞生存率を測定するキットです。測定は核酸蛍光染色剤と細胞溶解剤とを組み合わせ使用します。この核酸蛍光染色剤は、細胞膜に障害を受けた死細胞の膜を通過して核酸と反応することにより蛍光を発生し、生細胞に対しては膜透過性を示さない特徴があります。この性質を利用した蛍光測定により、高感度測定が可能となり、また接着、浮遊細胞ともに使用可能です。従って、下記の様な項目の測定に有効です。

- 細胞毒性測定試験
- 細胞増殖能測定試験
- 細胞の生死の割合の測定（アポトーシス／ネクローシス等）

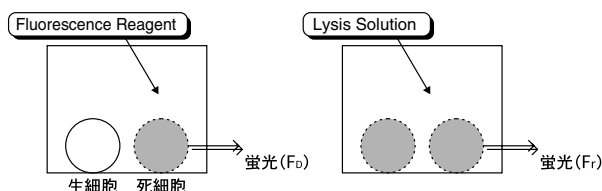
【特長】

- (1) 同一のウェル内で死細胞数、全細胞数および細胞生存率が短時間で測定可能。
- (2) 2 ステップで操作が完了、迅速な測定が可能である（5 分程度）。従って多検体処理に有効。
- (3) 測定試料に対して培地交換、細胞洗浄、細胞遠心分離、色素溶解などの煩雑な操作が不要。
- (4) 酵素反応を利用しないため、薬剤による pH の変動、測定温度、反応時間、血清添加の培養液に含まれる酵素活性などの影響を受けにくい。
- (5) ラジオアイソトープ、有機溶媒等を使用しないので取り扱い操作および試験後の廃棄が容易。
- (6) 本蛍光法は、死細胞を選択的に検出でき、従来の吸光測定法に比べ高感度測定が可能。

【細胞毒性試験の原理】

Fluorescence Reagent は、核酸と結合していない状態では蛍光強度は 0 付近ですが、核酸と結合すると蛍光強度が 100 ～ 1,000 倍増強します。また、この試薬は生細胞に対しては膜透過性を示さず、細胞膜に障害のある死細胞の核酸と結合して蛍光を発生します。この原理を利用することにより、以下のステップで死細胞数、全細胞数、細胞生存率を算出します。

- 1) 測定系に Fluorescence Reagent を添加し、その蛍光強度 $[F_D]$ から測定系内の死細胞数を定量します。
- 2) 同一の測定系にさらに Lysis Solution を添加し、生細胞膜に障害を与えた後、蛍光強度 $[F_r]$ を測定して、測定系に存在する全細胞数を定量します。
- 3) F_r と F_D の差を算出し、全細胞数蛍光強度 $[F_r]$ で割ることにより細胞生存率を算出します。



【内 容】

- | | | |
|-------------------------|-------------|-----|
| 1. Fluorescence Reagent | 500 μ L | 1 本 |
| 2. Lysis Solution | 10 mL | 1 本 |

※ あらかじめ必要量を小分けして使用される事をお勧めします。

(例) Fluorescence Reagent 50 μ L/100 回

【貯 法】 -20℃

【キット以外に必要なもの】

〈試 薬〉

細胞培養用培地

細胞 (接着系、浮遊系どちらでもよい)

蒸留水 (滅菌済み)

〈器 具〉

【推奨測定機器・器具】

1. 蛍光マイクロプレートリーダー

【蛍光マイクロプレートリーダーインフィニットシリーズ】

2. マイクロピペット

【フィンピベットデジタル 100 ~ 1000 μ L, 和光コード ; 530-67311】

3. マイクロピペット用チップ

【バイオクリーンチップワコー 1000 II, 和光コード ; 298-35031】

【その他、必要器具】

1. 遠心チューブ (50 mL サイズ)

2. マイクロピペット

【フィンピベットデジタル 20 ~ 200 μ L, 和光コード ; 533-67301】

3. 血球計算盤

4. 細胞培養用器材 (培養用プラスチックフラスコ、プレートなど)

【使用方法】

〈測定準備〉

測定機器 (蛍光リーダー) の準備を行います。

(マルチプレートリーダー [インフィニットシリーズ] を使用される場合)

(1) コントロールパソコンを起動して、蛍光マイクロプレートリーダーインフィニットシリーズ (以下リーダーと略) の電源を入れ、リーダー制御ソフト i-Control (以下ソフトと略) を起動します。

(2) ソフトの測定条件設定画面で、下記の条件を設定します。

Read Mode : Fluorescence
Excitation : 420 nm (フィルター半値幅 10 nm 以下)
Emission : 460 nm (フィルター半値幅 10 nm 以下)
Read : Top
Shake : linear、high、120 sec
Gain : optimal^{※1}
Delay Time : 10
Lag Time : 0
Integration Time : 40
Flash Number : 100

※1 : 測定感度をサンプルの蛍光強度に最適化する機能です。測定毎に最適化を行います。

注意 : 他社蛍光リーダーをご使用になられる場合は、お手持ちの蛍光リーダーの測定条件を上記測定条件に合わせて設定して下さい。

〈Fluorescence Reagent 溶液の調製〉

蒸留水 950 μ L に Fluorescence Reagent 50 μ L を加えた後、ボルテックスミキサーで良く攪拌し使用時まで氷上で保存します。

〈測 定〉

(1) 1 ウェルあたり 200 μ L の細胞懸濁液を蒔き込み、培養または、薬剤処理後のプレートにマイクロピペットを用いて Fluorescence Reagent 溶液を 1 ウェルあたり 10 μ L 添加します。

(2) プレートをリーダーにセットし、上記測定条件で測定します。(得られた蛍光強度とスタンダード検量線から測定系内の死細胞数が算出できます)。

(3) 死細胞数を測定したプレートに、マイクロピペットを用いて Lysis Solution を 1 ウェルあたり 10 μ L 添加します。

- (4) プレートの縁を軽く手のひらでたたき Lysis Solution を拡散させ、生細胞にダメージを与え、プレートをリーダーにセットし、上記測定条件で測定します。(得られた蛍光強度とスタンダード検量線から測定系内の全細胞数が算出できます)。

※注意：リーダーに検出感度（インフィニットの場合 Gain）を自動調節する機能がある場合は、下記に示すスタンダード検量線の測定を行って、測定系に適した検出感度に固定して死細胞数、全細胞数の測定を行って下さい。(測定感度を測定毎に変更してしまうと、測定蛍光値と細胞数の相関が検討できなくなります)。

【スタンダード検量線の測定】

〈スタンダード細胞懸濁液の調製〉

- (1) 常法で対数増殖期まで培養した細胞を遠心チューブ（50 mL サイズ）に回収します。
- (2) 遠心（1,500 rpm、5 min、室温）した後、ペレットに注意しながら上清を除きます。
- (3) ペレットに培地を 10 mL 加え、ピペットで吸引/排出を繰り返し、細胞をよく懸濁します。
- (4) 再度、遠心（1,500 rpm、5 min、室温）した後、ペレットに注意しながら上清を除きます。
- (5) ステップ (3) と同じ作業を 1 回繰り返します。
- (6) 血球計算盤で細胞数を計測します。
(必要に応じて細胞懸濁液を希釈して計測してください。)
- (7) ご使用血球計算盤の計算式を用いて細胞懸濁液の細胞密度を算出します。
・計算式例
$$\text{細胞密度 (cell/mL)} = \text{計測細胞数平均値 (cell)} \times \text{希釈倍率} \times 10^4$$
- (8) 算出した細胞密度から希釈倍率を計算し、最終細胞密度が $5 \times 10^4 \text{ cell/mL}$ となるように細胞懸濁液を調製します。

〈スタンダード細胞蒔き込み & 希釈系列作製〉

- (1) ご使用の培養プレート、または、蛍光測定用マイクロプレートに上記で調製した細胞懸濁液をゆっくり揺らして細胞を均一に分散させます。
- (2) マイクロピペットで細胞懸濁液を 400 μL とり、マイクロプレートのウェル B11 ~ G11（計 6 ウェル）に蒔き込みます。(図 1 参照)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A											400 μL	
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

図 1

- (3) マイクロピペットで培地を 200 μL とり、蛍光測定用マイクロプレートのウェル B2 ~ G10（計 54 ウェル）に分注します。(図 2 参照)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		200 μL /well										
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

図 2

- (4) ステップ (2) で蒔き込んだ細胞懸濁液のうち、200 μL をマイクロピペットで分取し、隣のウェル B10 ~ G10 に分注します。
- (5) ステップ (4) を B4 ~ G4 まで繰り返し、最終希釈では分取した B4 ~ G4 は 400 μL になるため、200 μL 溶液は廃棄します。本作業により 8 段階の希釈系列が作製されます。(図 3 参照)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	細胞数	0	0	78.13	156.3	312.5	625	1250	2500	5000	10000	
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

図 3

〈測 定〉

- (1) 希釈系列を作製したプレートの B2 ～ G11 の各ウェル（計 60 ウェル）に調製した Fluorescence Reagent 溶液をマイクロピペットを用いて 10 μ L 分注し、プレートの縁を横から指で軽くたたいて、試薬を拡散させます。
- (2) 続けて、B2 ～ G11 の各ウェル（計 60 ウェル）に Lysis Solution をマイクロピペットで 10 μ L 加え、プレートの縁を横から指で軽くたたいて試薬を拡散させます。
- (3) リーダーに、プレートをセットして測定を行います。

〔結果判定〕

〈ブランク補正値の算出〉

得られた蛍光強度値データからブランク補正値を、以下の計算式で算出します。

ブランク補正値 = (各ウェル蛍光強度値) - ブランク蛍光強度値

※ 補足；ブランク蛍光強度値算出法

$$\text{ブランク蛍光強度値} = \frac{\text{B2 から G3 の蛍光強度値の総和}}{12 \text{ (ウェル数)}}$$

〈平均蛍光強度値の算出〉

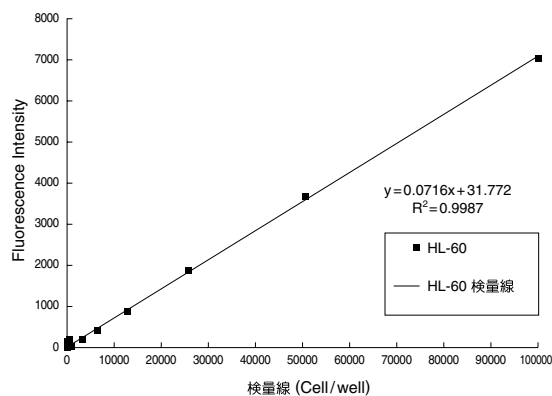
算出したブランク補正値の各細胞数ウェル毎の平均蛍光強度値を、以下の計算式で算出。

$$\text{平均蛍光強度値} = \frac{\text{各細胞数ウェルの蛍光強度値の総和}}{6 \text{ (ウェル数)}}$$

〈検量線の作成例〉

算出した平均蛍光強度値と細胞数の相関を検量線を作成して判定。

測定例：蛍光／吸光マルチプレートリーダー HL - 60 細胞を用いて、上記の測定方法で検量線サンプルを作成し、測定した結果。



製造発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社

大阪市中央区道修町三丁目1番2号

Tel : 06-6203-3741

2308KA2