



产品说明书

CytoTox 96[®]非放射性细胞毒性检测

G1780 产品使用说明书



www.promega.com.cn

Part # CTB163

CytoTox 96® 非放射性细胞毒性检测

所有技术文献的英文原版均可在下面网址获得 www.promega.com/tbs。请访问该网页查看您使用的说明书是否为最新版本。如果您在使用这个试剂盒时有任何问题，请与 Promega 技术服务部联系。电子邮件：chinatech@promega.com.cn。

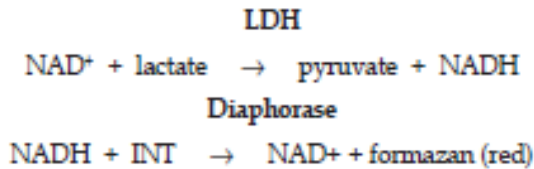
1. 描述.....	1
2. 产品组分和储存条件.....	4
3. 注意事项.....	4
A. 背景吸光值校正.....	4
B. CytoTox 96®检测对照的设置.....	4
4. 优化靶细胞数.....	4
A. 检测板的设置.....	5
B. 裂解细胞与收获上清.....	6
C. 测量LDH.....	6
5. 细胞介导的细胞毒性检测.....	6
A. 检测板的设置.....	6
B. 细胞培养与上清的收获.....	7
C. 测量LDH.....	7
D. 实验结果的计算.....	8
6. 使用单一细胞群的检测.....	9
A. 总细胞数检测.....	9
B. 细胞毒性检测.....	10
7. 疑难排查.....	11
8. 参考文献.....	11
9. 附录.....	12
A. 缓冲液和溶液的组成成分.....	12
B. 相关产品.....	12

1. 描述

CytoTox 96®非放射性细胞毒性检测是基于比色法的检测方法，可替代⁵¹Cr释放法。CytoTox 96®检测定量地测量乳酸脱氢酶(LDH)。LDH是一种稳定的胞质酶，在细胞裂解时会释放出来，其释放方式与⁵¹Cr在放射性分析中的释放方式基本相同。释放出的LDH在

培养基上清中，可通过 30 分钟偶联的酶反应来检测，在酶反应中 LDH 可使一种四唑盐 (INT) 转化为红色的甲臃 (formazan)。生成的红色产物的量与裂解的细胞数成正比。可见光吸光度数据可以用标准的 96 孔读板计收集。用四唑盐与心肌黄酶 (diaphorase) 或其他电子接受体结合来测定 LDH 的方法已经应用多年 (1)。有文献报道使用这种技术来测量自然的细胞毒性，得出的数值与用 ^{51}Cr 释放法平行对照测定得出的数值完全相同 (在实验误差之内) (2, 3)。

CytoTox 96[®]检测的一般化学反应如下：



CytoTox 96[®]检测的应用：

- 细胞介导的细胞毒性 (4)
- 化合物或其他药物介导的细胞毒性 (5-8)
- 总细胞数 (9)

CytoTox 96[®]检测的优势：

- 无需在实验前标记细胞
- 无需准备放射性实验所需的相关文件，也没有与放射性实验相关的安全问题。
- 可以使用标准的读板计
- 可以发现早期、低水平的细胞毒性

CytoTox 96[®]检测的引用文献摘选

- Spagnou, S., Miller, A.D. and Keller, M. (2004) Lipidic carriers of siRNA: Differences in the formulation, cellular uptake, and delivery with plasmid DNA. *Biochemistry* **43**, 13348–56.

The CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay was used to determine the cytotoxic effect of lipophilic transfection reagents commonly used for siRNA transfection. Data are presented as the percent cell death observed in HeLa and IGROV-1 cells at 24 hours posttransfection.

- Hernández, J.M. *et al.* (2003) Novel kidney cancer immunotherapy based on the granulocytemacrophage colony-stimulating factor and carbonic anhydrase IX fusion gene. *Clin. Cancer Res.* **9**, 1906–16.

The CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay was used to determine specific cytotoxicity of human dendritic cells transduced with adenoviruses encoding a fusion protein of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and carbonic anhydrase IX.

如想参考更多引用CytoTox 96[®]检测的专家评审文章，请访问：

www.promega.com/citations

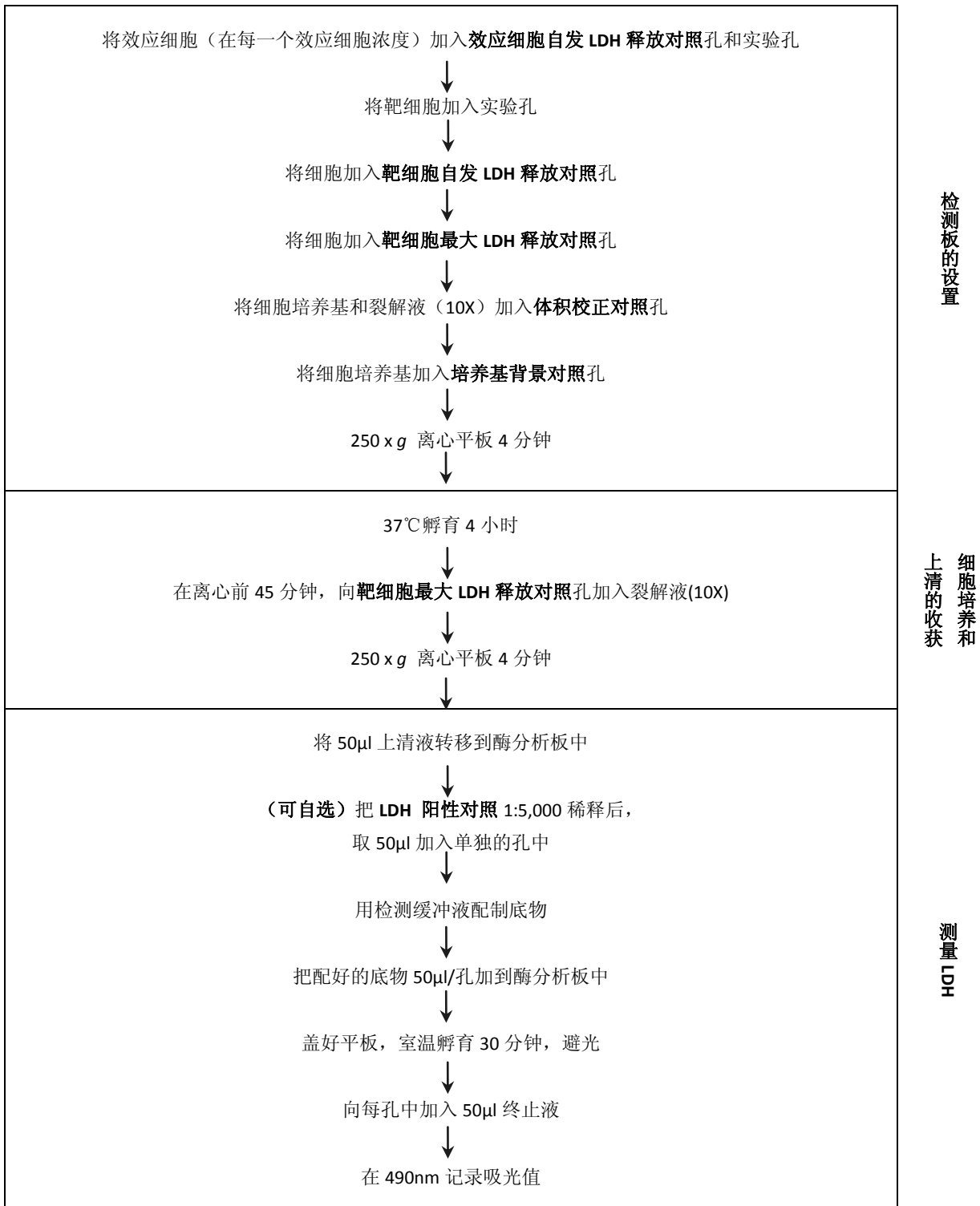


图 1. CytoTox 96®非放射性细胞毒性检测实验流程。

2. 产品组分和储存条件

产品	包装	目录号#
CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	1,000 次	G1780

供实验室使用。包括：

- 5 瓶 底物混合物 (Substrate Mix)
- 60ml 检测缓冲液 (Assay Buffer)
- 25µl LDH阳性对照 (LDH Positive Control)
- 3ml 裂解液 (10X) (Lysis Solution (10X))
- 65ml 终止液 (Stop Solution)

储存条件: -20°C 储存底物混合物和检测缓冲液。配好的底物可在-20°C 保存 6-8 周，活性不会降低。LDH 阳性对照、裂解液 (10X) 和终止液在 4°C 储存。

注意: 在储存过程中，检测缓冲液可能有沉淀形成。此沉淀不影响产品性能。可以 350 x g 离心 5 分钟去除沉淀。然后取 12ml 上清溶解底物混合物。

3. 注意事项

3.A. 背景吸光值校正

使用 CytoTox 96®检测时，组织培养基中有两个因素会引起背景吸光：培养基中的酚红和动物血清中的 LDH。来自这两种因素的背景吸光值都可以通过设置一个培养基背景对照来校正。从该对照测定出的吸光值被用来校正从其它样品测出的吸光值（见第 5.D 部分）。来自酚红的背景吸光也可以通过使用不含酚红的培养基来消除。

动物血清中 LDH 的量随几种参数而变，包括动物种类、收集血清前动物健康状况及对动物的处理等。人 AB 血清的 LDH 活性相对较低，而小牛血清 LDH 活性则相对较高。可以通过降低血清浓度来减小其中的 LDH 造成的背景吸光 (3)。一般来说，把血清浓度降低到 5%会显著减小背景而不影响细胞活力。对细胞介导的细胞毒性检测，不推荐用 1%BSA 代替血清。

3.B. CytoTox 96®检测对照的设置

进行 CytoTox 96®检测的实验时，必须要做下面所列出的五个对照。对照#2 和#3 与标准的 ⁵¹Cr 释放检测中的对照是完全相同的（靶细胞自发释放和靶细胞最大释放）。另外的三个对照可解释其它来源的 LDH 活性。

1. **效应细胞自发 LDH 释放:** 校正效应细胞自发释放出来的 LDH。
2. **靶细胞自发 LDH 释放:** 校正靶细胞自发释放出来的 LDH。
3. **靶细胞最大 LDH 释放:** 计算时需要该对照以确定 100%的 LDH 释放。
4. **体积校正对照:** 校正由于加入裂解液 (10X) 引起的体积变化。

注意: 如果使用冻融裂解法取代加入 Lysis Solution (10X)的方法来获得靶细胞最大 LDH 释放值，体积校正对照可以省略。

5. **培养基背景对照:** 校正由培养基中血清产生的 LDH 活性以及酚红造成的背景吸收。

4. 优化靶细胞数目

由于不同类型的靶细胞 (YAC-1, K562, Daudi, 等等) 含有不同量的 LDH，我们建议用您的靶细胞群做一个预实验，确定使用 CytoTox96®检测最合适的靶细胞数，以确保足够的信噪比 (图 2)。试剂盒提供的 LDH 阳性对照可以用来验证 LDH 的检测是否正常。

用户需自备的材料

(在第 9.A.部分可以查到溶液的组成成分)

- 圆底或 V-底 96 孔细胞培养板
- 多道移液器 (排枪)
- 可自选: PBS+1% BSA (牛血清白蛋白)

4.A. 检测板的设置

1. 在圆底或 V-底 96 孔细胞培养板中对每种靶细胞做系列稀释, 做三或四个重复孔。培养基的体积和终体积要与将在细胞毒性检测中使用的一样。例如, 如果您一般用 50 μ l/孔靶细胞与 50 μ l/孔效应细胞共培养, 就用 100 μ l/孔准备系列稀释。
2. 准备三或四个复孔的无细胞培养基背景对照。
3. 可自选: 如果您想做 LDH 阳性对照, 可以先轻轻振荡 LDH 阳性对照以混匀, 然后取 2 μ l 稀释到 10ml 的 PBS+1% BSA (1:5,000 稀释)。这个溶液每次都要新鲜配制。阳性对照的体积要与含有细胞孔的体积相等。建议做三或四个复孔。

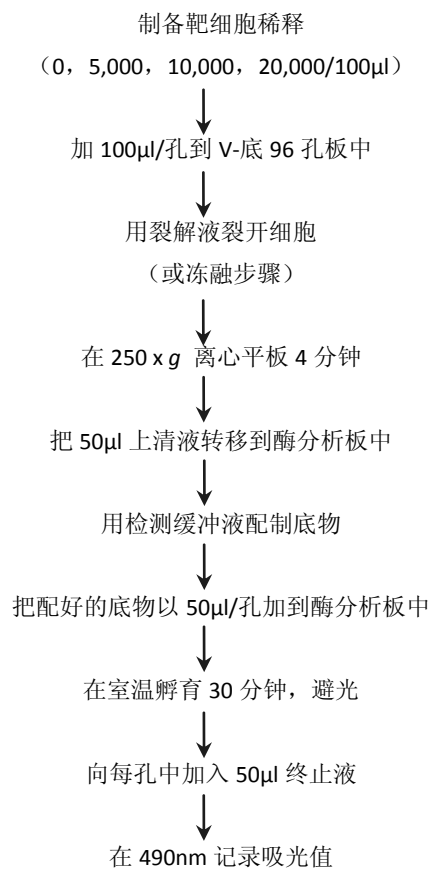


图 2. 优化靶细胞数目。

4.B. 裂解细胞与收获上清

1. 向所有孔中按每 100 μ l 培养基加入 10 μ l 裂解液 (10X), 裂解细胞。
2. 在 37 $^{\circ}$ C, 5% 的湿润 CO₂ 培养箱中孵育 45 分钟。

注意: 第 1 和第 2 步也可以这样做: 在 -70 $^{\circ}$ C 放置细胞大约 30 分钟, 再在 37 $^{\circ}$ C 融化 15 分钟。继续第 3 步。

3. 在 250 x g 离心平板 4 分钟。

4.C. 测量 LDH

1. 从每一个孔中取出 50 μ l 转移到一个新的 96 孔平底 (酶分析) 板中。
2. 融化检测缓冲液 (Assay Buffer), 取出 12ml, 然后迅速把未用的部分放回到 -20 $^{\circ}$ C 保存。可以用 37 $^{\circ}$ C 水浴融化 Assay Buffer, 但是一旦融化后不要再于 37 $^{\circ}$ C 放置。

注意: 储存后 Assay Buffer 可能出现沉淀。这些沉淀不会影响检测结果。沉淀可以在 300 x g 离心 5 分钟去除。然后可以取 12ml 的上清配制底物混合物 (Substrate Mix)。

把 12ml Assay Buffer 暖至室温 (避光)。然后把这 12ml 室温的 Assay Buffer 加入到一瓶 Substrate Mix 中, 轻轻颠倒摇晃使底物溶解。一瓶底物足够做两块 96 孔板。一旦溶解, 避免强光直射底物, 立即使用。

3. 向每孔中加入 50 μ l 配好的底物混合物, 用锡箔纸或不透明的盒子盖住平板以避光。在室温孵育 30 分钟。

注意: 未用完的已溶解的底物混合物应盖紧放在 -20 $^{\circ}$ C, 可以储存 6—8 周。

4. 向每孔中加入 50 μ l 的终止液 (Stop Solution)。
5. 用注射器针头把大气泡戳破, 加入 Stop Solution 后一小时之内在 490 或 492nm 测量吸光值。
6. 确定靶细胞的吸光值至少是培养基背景对照吸光值的两倍时的靶细胞浓度。

注意: 如果您一般按照 100 μ l/孔靶细胞和 100 μ l/孔效应细胞进行共培养, 可以通过共培养 50 μ l/孔同样数目的细胞来提高靶细胞的灵敏度。这样, 释放出的 LDH 浓度可以提高。

5. 细胞介导的细胞毒性检测

5.A. 检测板的设置

按下列指导设置 96 孔板。每个实验和对照组都应该设三或四个重复孔。建议参考图 3 设置平板。

1. **效应细胞自发 LDH 释放:** 把要用于实验孔的**每一浓度**的效应细胞按三或四个复孔加到含有培养基的孔中以获得效应细胞自发释放值。终体积**必须**与实验孔相同 (用不含细胞的培养基来补足体积)。
2. **实验孔:** 向 V-底或圆底 96 孔板的所有实验孔中加入固定数量的靶细胞 (由第 4 部分确定)。将效应细胞按三或四个复孔加入孔中, 加入不同数量的效应细胞来测试几组效靶细胞比率。效靶细胞合在一起的终体积至少应该是 100 μ l/孔。
3. **靶细胞自发 LDH 释放:** 将靶细胞 (浓度由第 4 部分确定) 加入到含有培养基的三或四个复孔中, 终体积必须与含有靶细胞和效应细胞的实验孔相等 (用培养基调整体积)。
4. **靶细胞最大 LDH 释放:** 将靶细胞 (浓度由第 4 部分确定) 加入到含有培养基的三或四个复孔中, 终体积必须和实验孔相等。每 100 μ l 培养基加 10 μ l 的 Lysis Solution (10X)。这会产生浓度约 0.8% 的 Triton[®] X-100, 该浓度的 Triton[®] X-100 应该会使靶细胞完全裂解。在收获上清前, 使靶细胞在 Lysis Solution 中孵育 45 分钟。
5. **体积校正对照:** 将 10 μ l Lysis Solution (10X) 加入到含有 100 μ l 培养基 (不含细胞) 的三或四个复孔中。该对照用于校正加入 Lysis Solution (10X) 引起的体积变化。这个体积变化影响酚红和血清的浓度, 从而影响吸光值。
6. **培养基背景:** 将 100 μ l 培养基加入三或四个复孔中。该对照用于校正酚红和含有血清的培养基中的 LDH 活性引起的背景

吸光值。

7. **LDH 阳性对照 (可自选):** 试剂盒中包含一个阳性对照 (牛心 LDH) 以帮助确认试剂盒中其它组分的性能。如果您愿意做一个 LDH 阳性对照, 那么可以温和震荡 LDH Positive Control 使其混匀, 然后取 2 μ l 加入 10ml PBS+1%BSA 中 (1:5,000 倍稀释)。该溶液需每次使用前新鲜配制。加入孔中的终体积必须与实验孔相等。1:5,000 倍稀释的 LDH Positive Control 中的酶量与 13,500 个裂解的 L929 成纤维细胞中的酶量大致相同。建议做三或四个复孔。
8. 250 X g 离心板子 4 分钟以确保效应细胞和靶细胞充分接触

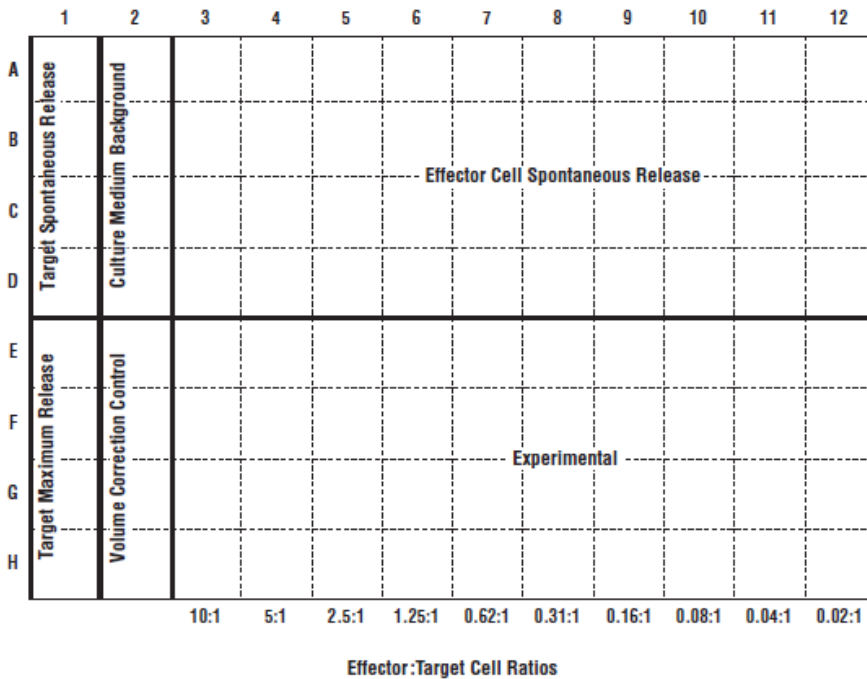


图 3. CytoTox 96®非放射性细胞毒性检测板设置示例。 上图是一个具有代表性的 96 孔板平板设置, 其中包含了 CytoTox 96®检测所必需的实验和对照孔。每一个实验和对照反应都应该设置三或四个复孔。

5.B. 细胞培养与上清的收获

1. 在 37°C, 5% CO₂ 湿润的细胞培养箱中孵育细胞毒检测板 4 小时。最低需要 4 小时孵育以保证靶细胞和效应细胞充分接触。
2. 在收集上清前 45 分钟, 向靶细胞最大释放孔加入 10 μ l Lysis Solution (10X)/100 μ l 靶细胞。

注意: 如果靶细胞未被彻底裂解 (通过镜下观察确定), 再加入 5 μ l 的 Lysis Solution (10X)。

3. 孵育 4 小时后, 250 X g 离心板子 4 分钟。

5.C. 测量 LDH

1. 用排枪从每孔转移 50 μ l 上清至一个新的 96 孔平底 (酶分析) 板中。
2. 融化 Assay Buffer, 取出 12ml, 迅速将未用的部分储存在 -20°C。可以用 37°C 水浴融化 Assay Buffer, 但是一旦融化不要再于 37°C 放置。

将取出的 12ml Assay Buffer 平衡到室温 (注意避光), 然后将这 12ml Assay Buffer 加入到一瓶 Substrate Mix 中。轻轻颠倒摇晃使底物溶解。一瓶底物足够做两块 96 孔板。底物一旦溶解, 要避免强光直射, 立即使用。

3. 向含有转移过来的样品上清的 96 孔酶分析板中每孔均加入 50 μ l 配好的底物。用铝箔纸或不透明的盒子覆盖板子使之避光,

室温孵育 30 分钟。

注意：未用完的底物混合物应盖紧后放在-20℃，可以储存 6—8 周。

4. 每孔加入 50μl Stop Solution。
5. 用注射器针头戳破大的气泡，加入 Stop Solution 后 1 小时内在 490 或 492nm 测量吸光值。

5.D. 实验结果的计算

1. 将所有实验孔、靶细胞自发 LDH 释放孔和效应细胞自发 LDH 释放孔的吸光值减去培养基背景吸光值的均值。
2. 将靶细胞最大 LDH 释放对照的吸光值减去体积校正对照吸光值的均值。
3. 将步骤 1 和 2 中获得的经过校正的值带入下面公式，计算每个效靶比所产生的细胞毒性百分比。

$$\% \text{细胞毒性} = \frac{\text{实验} - \text{效应细胞自发} - \text{靶细胞自发}}{\text{靶细胞最大} - \text{靶细胞自发}} \times 100$$

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	.477	.478	.641	.549	.501	.515	.490	.485	.503	.496	.459	.480
B	.469	.436	.660	.541	.513	.501	.478	.478	.495	.482	.451	.472
C	.471	.470	.644	.548	.521	.499	.498	.470	.502	.476	.474	.471
D	.474	.472	.661	.552	.528	.501	.491	.483	.490	.485	.484	.475
E	.638	.443	.816	.686	.619	.556	.499	.501	.515	.481	.497	.478
F	.655	.447	.809	.705	.610	.554	.529	.495	.511	.477	.504	.486
G	.664	.446	.824	.697	.620	.558	.520	.497	.495	.483	.462	.484
H	.680	.440	.829	.709	.593	.563	.523	.511	.511	.485	.489	.493
			10:1	5:1	2.5:1	1.25:1	0.62:1	0.31:1	0.16:1	0.08:1	0.04:1	0.02:1

Effector: Target Cell Ratios

图 4. 用 CytoTox 96®非放射性细胞毒性检测试剂盒在 Promega 所做实验的代表性数据。产生这些数据的实验条件见本部分（5.D.）。

计算实例

下面的计算实例是基于图 4 的数据。这些数据是用 CytoTox96® 检测以及下面的实验条件获得。

效应细胞：从雄性 C3H/HeJ 小鼠制备的 NK/LAK 细胞。尼龙网过滤的不贴壁脾细胞用 rhIL-2 (500ng/ml) 培养 5 天，再用于细胞毒试验。

靶细胞：YAC-1 细胞，直立培养，悬浮细胞系。

检测用的培养基：含酚红的 RPMI 1640 + 15mM HEPES + 5% FBS。

板子：96 孔圆底板。

靶细胞铺板：10,000 细胞/孔，在 50μl 培养基中。

效应细胞铺板：与靶细胞的比例为 10:1 至 0.02:1，在 50μl 培养基中。

孵育：4 小时，37℃，5% CO₂。

计算实例 (继续)

1. 实验孔, 10:1 效靶细胞比 (均值) - 培养基背景 (均值) =

$$0.819 - 0.464 = \mathbf{0.355}$$

靶细胞自发 (均值) - 培养基背景 (均值) =

$$0.472 - 0.464 = \mathbf{0.008}$$

效应细胞自发- 培养基背景 (均值) =

$$0.651 - 0.464 = \mathbf{0.187}$$

2. 靶细胞最大 (均值) - 体积校正对照 (均值) =

$$0.659 - 0.444 = \mathbf{0.215}$$

3. %细胞毒性 = $\frac{\text{实验} - \text{效应细胞自发} - \text{靶细胞自发}}{\text{靶细胞最大} - \text{靶细胞自发}} \times 100$

$$\% \text{细胞毒性} = \frac{0.355 - 0.187 - 0.008}{0.215 - 0.008} \times 100$$

$$= \mathbf{77.3\%} \quad (10:1 \text{ 效靶细胞比})$$

6. 使用单一细胞群的检测

6.A. 总细胞数检测

CytoTox 96® Assay 间接地测量完整细胞胞质中的乳酸脱氢酶活性。因此, 只有裂解细胞使其中的 LDH 释放出来才能对细胞定量。某些去污剂 (SDS 和溴化十六烷基三甲铵 (或称西曲溴铵)) 会抑制终产物红色甲脒的生成。而 CytoTox 96® 检测中包含的裂解液可以用来做细胞裂解, 如按照建议使用不会影响检测。

细胞样品通过如下方式裂解: 每100µl培养基加入15µl裂解液 (9% (v/v) Triton® X-100 溶于水) 后, 在37°C 孵育45-60分钟。然后把50µl样品上清转移到一个新的96孔酶分析板中。再把配制好的底物混合物 (50µl) 加入到每个上清样品中, 让酶反应在室温进行30分钟, 注意避光。每孔加入50µl 终止液终止酶反应。可以用酶标仪在490nm测量吸光值。细胞数与吸光值成正比, 吸光值代表LDH的活性。得到的数据可以用来作图: 490nm吸光值作为“y-轴”, 细胞数作为“x-轴”。图5概况了这些操作步骤。

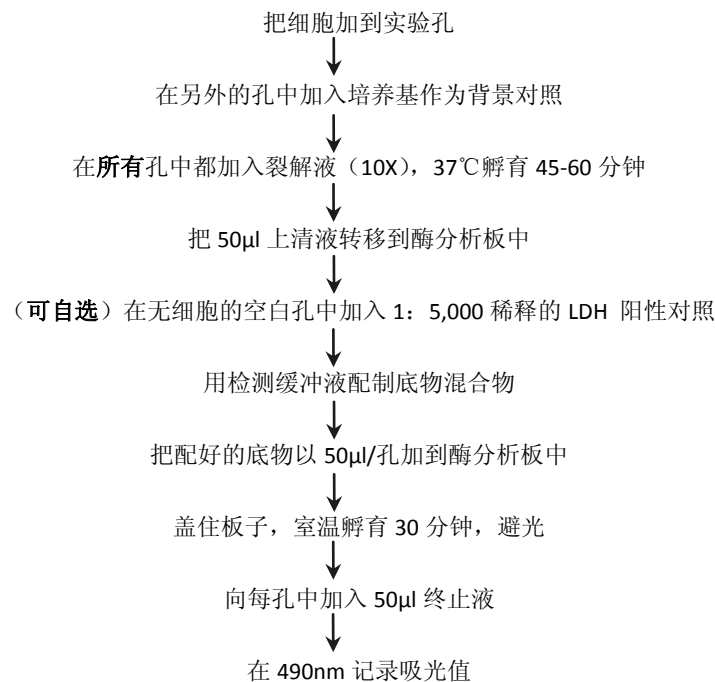


图 5. 为检测总细胞数而修改的 CytoTox 96®非放射性细胞毒性检测操作步骤。

6.B. 细胞毒性检测

CytoTox 96®检测也可以用来检测培养中的单一类型细胞（即没有效应细胞）的死亡，例如在用有细胞毒性的药物处理之后（10）。图 6 给出了一个操作步骤示例，在该示例中 CytoTox 96®检测被用来测量由转染的 N-甲基-D-天冬氨酸盐（NMDA）受体引起的细胞死亡（11）。

操作流程

使用磷酸钙转染法把所需的 NMDA 受体亚单位基因转入 HEK293 细胞，孵育（12）。



20 小时后，收集培养基样品以评估由于细胞死亡引起的 LDH 释放。

4℃ 离心 5 分钟，用培养基稀释，转移到一个新的 96 孔板中。



用冻融法裂解转染的细胞，以评估最大 LDH 活性。收集一定体积的培养基，象前一步那样操作。



测量从细胞中自发释放的 LDH，并校正酚红以及血清中内源性 LDH 活性的影响。

检测

配制底物混合物，每个样品孔中加入 50μl



在室温孵育检测板 30 分钟，避光。



加入终止液，在 490nm 记录吸光值



从样品读数中减去背景值



用下面的公式计算细胞死亡的百分数

$$\% \text{细胞毒性} = \frac{\text{实验孔 LDH 释放 (OD 490)}}{\text{最大 LDH 释放 (OD 490)}}$$

图 6. 为测量由转染的 NMDA 受体引起的细胞死亡（11）而修改的 CytoTox 96®非放射性细胞毒性检测步骤（使用一种细胞类型的细胞毒性）。

7. 疑难排查

对于在此未涉及的问题，请联系 Promega 北京分公司。Email: chinatech@promega.com.cn.

问题表现	原因和评论
背景吸光值高	<p>培养基中的动物血清中存在内源性的 LDH。该背景正常情况下可以由培养基背景对照来校正。可以通过改变血清来源或降低血清浓度来减小背景吸光值。</p> <p>不同血清中 LDH 活性不一样，从低到高顺序为：人 AB 血清 < 马血清 < 胎牛血清 < 小牛血清。一般将血清浓度降低到 5% 时背景会显著降低而细胞活力不受影响。在细胞介导的细胞毒检测中不推荐用 1% BSA 代替血清。</p> <p>培养基中酚红的影响。该背景正常情况下可以由培养基背景对照来校正。如果愿意，也可以用无酚红的培养基。</p>
效应细胞或靶细胞自发 LDH 释放对照吸光值高	<p>由于培养条件或操作原因导致细胞膜“渗漏”。保持低细胞密度 (< 1.5×10^6 细胞/ml)，饲以新鲜培养基。避免培养基或清洗缓冲液有大的温度波动。当重悬细胞沉淀时避免剧烈吹吸，保持离心力 $\leq 250 \times g$。</p>
观察到的细胞毒性百分比低	<p>细胞毒性百分比太低而无法定量。如果想要提高细胞毒性百分比，可以将与杀伤细胞孵育的时间从 4 小时延长到 6-8 小时（第 5.B 部分）。不要孵育过夜，因为细胞增殖会导致结果不准确。</p>
吸光值超过了读板计的线性范围	<p>板子的孔里有气泡。轻轻用注射器针头戳破气泡，重新测吸光值。</p> <p>LDH 活性太高。重复实验，缩短 LDH 反应时间（第 5.C 部分，第 3 步）至 15-20 分钟。</p>
吸光值整体偏低	<p>读板计波长设置不正确。将读板计波长设为 490 或 492nm，重新测吸光值。</p> <p>底物被光降解。检查一下底物配制和 LDH 反应是否避光操作。</p>
靶细胞最大释放吸光值低	<p>靶细胞数没有优化。优化检测中使用的靶细胞数（第 4 部分）。</p>

8. 参考文献

- Nachlas, M.M. *et al.* (1960) The determination of lactic dehydrogenase with a tetrazolium salt. *Anal. Biochem.* **1**, 317–26.
- Korzeniewski, C. and Callewaert, D.M. (1983) An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.* **64**, 313–20.
- Decker, T. and Lohmann-Matthes, M.L. (1988) A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J. Immunol. Meth.* **115**, 61–9.
- Brander, C. *et al.* (1993) Carrier-mediated uptake and presentation of a major histocompatibility complex class I-restricted peptide. *Eur. J. Immunol.* **23**, 3217–23.

5. Behl, C. *et al.* (1994) Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* **77**, 817–27.
6. Lappalainen, K. *et al.* (1994) Comparison of cell proliferation and toxicity assays using two cationic liposomes. *Pharm. Res.* **11**, 1127–31.
7. Allen, M.J. and Rushton, N. (1994) Use of the CytoTox 96™ Assay in routine biocompatibility testing in vitro. *Promega Notes* **45**, 7–10.
8. Sinensky, M.C., Leiser, A.L. and Babich, H. (1995) Oxidative stress aspects of the cytotoxicity of carbamide peroxide: in vitro studies. *Toxicol. Lett.* **75**, 101–9.
9. Moravec, R. (1994) Total cell quantitation using the CytoTox 96™ Non-Radioactive Cytotoxicity Assay. *Promega Notes* **45**, 11–12.
10. Singer, C.A. *et al.* (1999) The mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J. Neurosci.* **19**, 2455–63.
11. Miroslav, C. *et al.* (1995) Using Promega's CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay to measure cell death mediated by NMDA receptor subunits. *Promega Notes* **51**, 21–22.
12. Gorman, C.M., Gies, D.R. and McCray, G. (1990) Transient production of proteins using an adenovirus transformed cell line. *DNA Prot. Eng. Technol.* **2**, 3.

9. 附录

9.A. 缓冲液和溶液的组成成分

PBS + 1% BSA

0.2g/L KCl
8.0g/L NaCl
0.2g/L KH₂PO₄
1.15g/L Na₂HPO₄
1% (w/v) 牛血清白蛋白

在去离子水中溶解，使用前过滤除菌。

Lysis Solution (10X)

9% (v/v) Triton® X-100

Stop Solution

1M acetic acid

9.B. 相关产品