

# IncuCyte™ NuLight™ BacMam 3.0 Reagents for Nuclear Labeling

Transiently transduce cells with a nuclear restricted fluorescent label.

## Presentation, storage and stability

IncuCyte™ NuLight™ BacMam 3.0 시약은 약  $1 \times 10^8$ /mL 농도의 viral particle 이 1vial 당 1mL 씩 제공되며, 1-2% v/v 농도로 5 개에서 10 개의 96-well microtiter plate 를 transduction 할 수 있습니다. 이 시약은 +4°C 에서 보관해야 하고 직사광선을 피해야 합니다. 또한, 시약을 얼리면 안됩니다. 이와 같이 보관을 하면 수령 후부터 약 6 개월간 보관할 수 있습니다.

## Background and intended use

IncuCyte™ NuLight™ BacMam 3.0 시약은 효과적이고 안정적으로 살아 있는 mammalian cell 의 핵을 형광 표지 할 수 있습니다. 매우 간단한 mix & read 방식을 이용하여 real-time 으로 cell counting 을 할 수 있으며, cell 의 doubling time 을 계산할 수 있습니다. IncuCyte™ NuLight™ BacMam 3.0 시약은 다양한 cell(primary cell, immortalized cell, dividing, non-dividing mammalian cell)에서 GFP (green fluorescent protein)나 mKate2 (red fluorescent protein)를 세포 기능의 변화나 독성 영향 없이 핵에만 국한하여 빠르게 발현하도록 합니다. 본 시약을 사용하면 원하는 cell 에 대해 stable cell line 을 만들지 않고도 쉽게 일시적인 transduction 효과를 확인 할 수 있습니다. 따라서, IncuCyte ZOOM® live cell imaging platform 으로 유용하게 사용할 수 있으며, real-time 으로 cell counting 을 할 수 있습니다. 또한, 자사 제품인 IncuCyte™ Cytotox Reagent(cytotoxicity)나 IncuCyte™ Caspase 3/7 reagent(apoptosis)와 혼합하여 사용할 수 있으므로 하나의 well 에서 proliferation 과 cell death 를 동시에 확인 할 수 있습니다.

## Recommended use

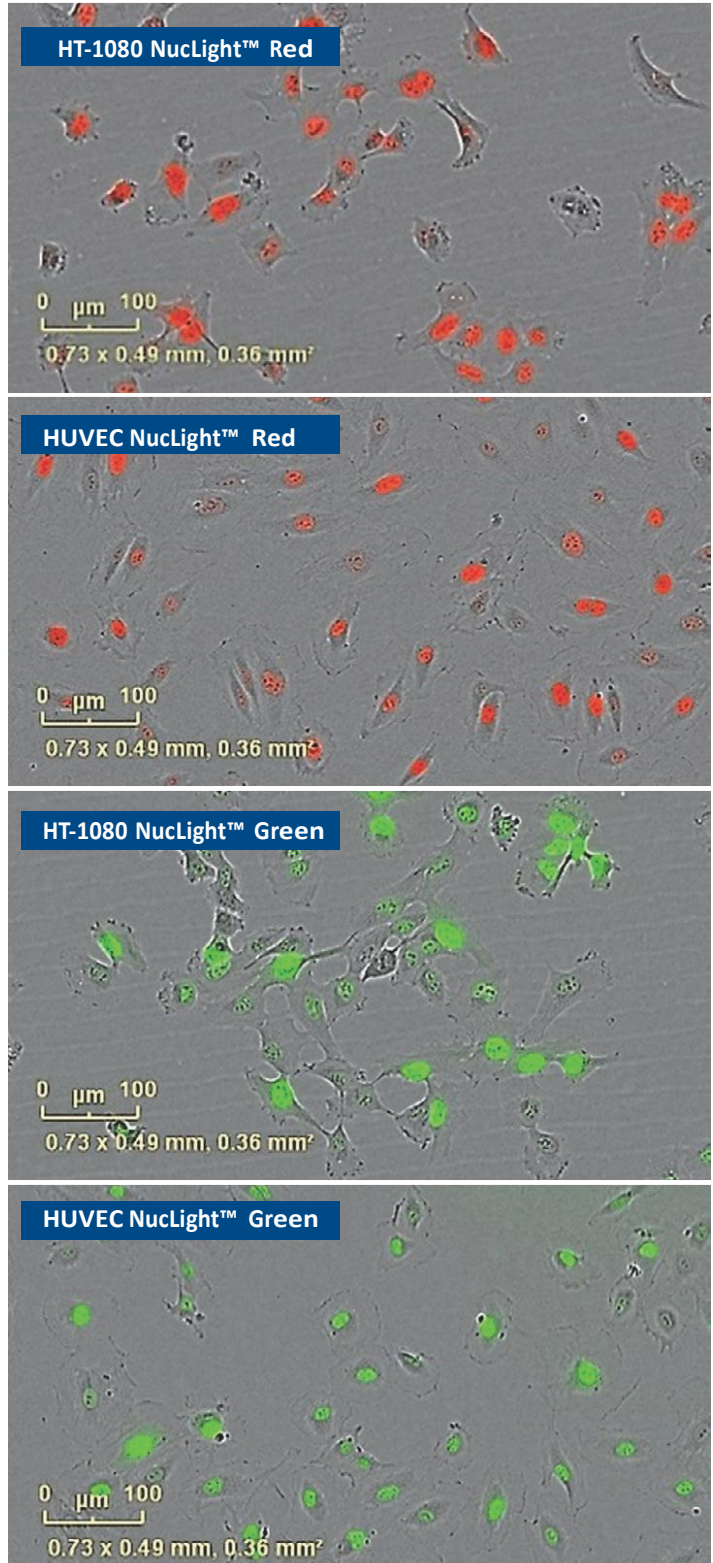
효율적인 transduction 을 위해서는 cell 을 IncuCyte™ NuLight™ BacMam 3.0 시약이 포함된 media 에 resuspension 한 후 seeding 하기를 권장합니다. 만약 cell 이 이미 seeding 되어 있다면 media 를 IncuCyte™ NuLight™ BacMam 3.0 시약이 포함된 media 로 교체하십시오. IncuCyte ZOOM® live cell imaging system 을 이용하여 proliferation 을 확인할 때 2 시간마다 imaging 하는 것을 추천드립니다. Website 에 있는 protocol 을 참조해 주십시오.

[essenbioscience.com/nuilight](http://essenbioscience.com/nuilight)

## Safety data sheet (SDS) information

Safety data sheet(SDS)는 website 에서 확인할 수 있습니다.

[essenbioscience.com/nuilight](http://essenbioscience.com/nuilight)



**Figure 1.** HUVEC cell 과 HT-1080 cell 에서 IncuCyte™ NuLight™ BacMam Green 또는 Red 3.0 시약 transduction 한 결과. 핵에 국한하여 mKate2 또는 GFP 발현.

**Quick guide**

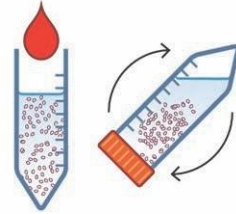
**1 HARVEST CELLS**



**Seeding 할 cell stock 준비**

Cell 을 harvest 하고 full growth media 에  $2 \times 10^4$  cells/mL 로 resuspension

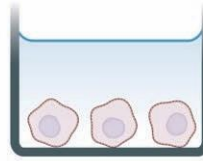
**2 TRANSDUCE**



**IncuCyte™ NuLight™ BacMam 3.0 시약 첨가**

Green 또는 Red NuLight™ BacMam 3.0 시약을 1-2% (v/v) 로 첨가하여 inversion.

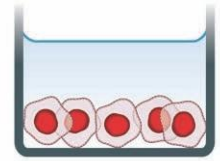
**3 SEED CELLS**



**Cell 을 seeding**

각 well 에  $2 \times 10^3$  개의 cell 을 100μL 에 풀어 seeding. 상온에서 30 분간 incubation.

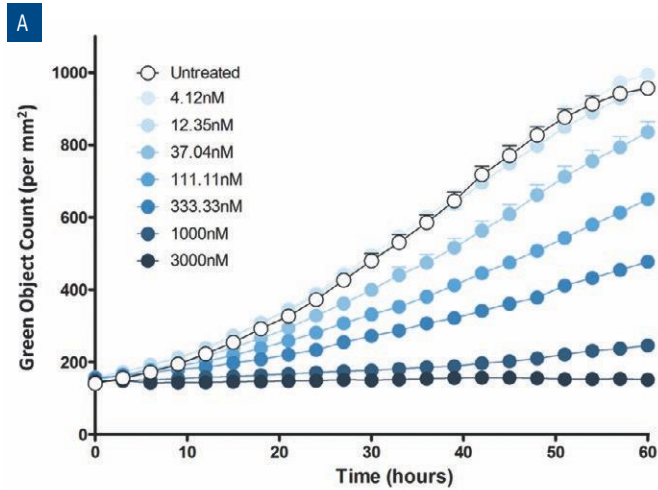
**4 LIVE CELL FLUORESCENT IMAGING**



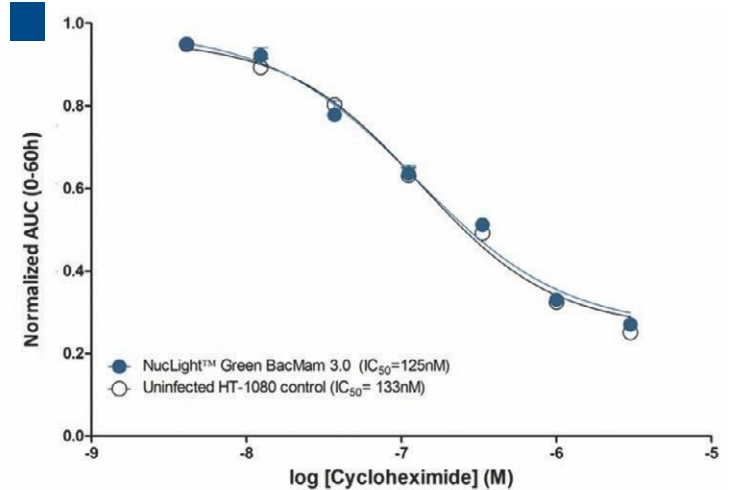
**Automated Imaging 과 정량적인 분석**

1-2 시간마다 IncuCyte ZOOM®의 4x, 10x, 20x lens 를 이용하여 imaging. 소프트웨어로 분석.

Figure 2. IncuCyte™ NuLight™ Green BacMam 3.0 시약으로 labeling 된 HT-1080 fibrosarcoma cell 에서 cyclohexamide 에 의한 proliferation 의 농도의존적인 억제 관찰.



(A) Cyclohexamide 가 없는 조건(open symbol)에서와 농도가 증가하는 조건(progressively darker blue symbols)에서 nuclear count 의 시간적 차이.



(B) Cyclohexamide 에 대한 농도 반응 곡선.

그래프(A)에서 IncuCyte™ NuLight™ Green BacMam 3.0 labeled cell 의 시간적 경과에 따른 area under the curve (AUC)값을 uninfected HT-1080 cell 의 AUC 와 비교.

**연구용으로만 사용하시고 치료 목적이거나 진단 목적으로 사용하지 마십시오.**

Product	Cat No.	Promote	Lot #	Viral Titer	Amount	Ex. maxima	Em. maxima
IncuCyte™ NuLight™ Red BacMam 3.0 Reagent	4621	CMV	F14682-51027280	$1.2 \times 10^8$ pfu/mL	1 mL	612 nm	631 nm
IncuCyte™ NuLight™ Green BacMam 3.0 Reagent	4622	CMV	F14683-51027280	$1.2 \times 10^8$ pfu/mL	1 mL	483 nm	506 nm

**Optimization protocol**

실험에 사용하기 전에 IncuCyt™ NuLight™ BacMam 3.0 시약 농도를 optimization 하기를 추천 드립니다. 하나의 96-well plate 상에서 다양한 cell type 에 대해 수행할 수 있습니다.

1. Proliferation assay 를 수행하기에 적합한 농도의 cell 을 growth media 에 넣습니다. 각 well 에 2,000 개의 cell 을 100µL growth media 에 풀어 seeding 하는 것을 권장합니다.

**Note:** Cell harvest 시에 80% confluence 를 넘지 않도록 하며, cell viability 90% 상태에서 transduction 합니다. 너무 높은 confluence 는 transduction efficiency 에 영향을 줄 수 있습니다.

2. IncuCyt™ NuLight™ BacMam 3.0 시약을 최종농도 1-2%(v/v)로 cell 에 넣고 inversion 하여 혼합합니다. 이것은 권장농도이며, cell type 에 따라 0.5-4%(v/v) 농도로 처리할 수 있습니다. Uninfected control 과 함께 toxicity 정도를 평가합니다. Optimization set-up 관련 예시는 밑에 제시되어 있습니다.

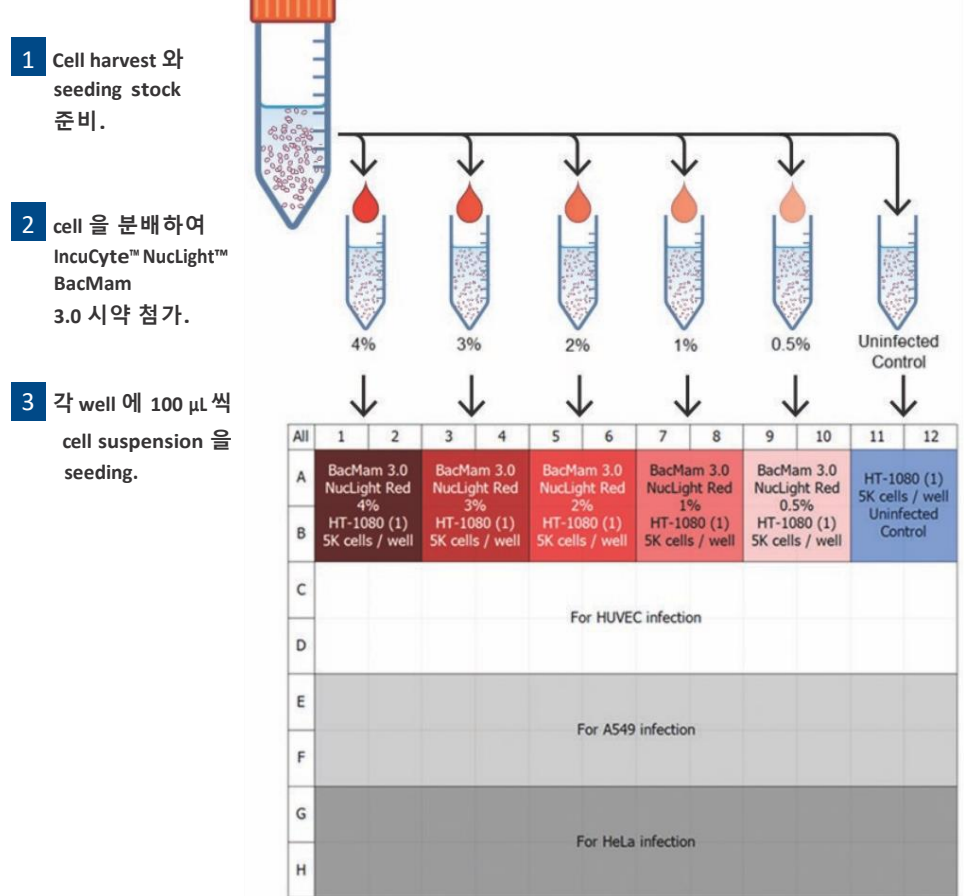
3. Multi-channel pipette 을 이용하여 각 well 에 200 개의 cell 을 100 µL media 에 풀어 seeding 합니다. Scanning 전에 상온에 20 분 정도 놓아둡니다.

4. 96-well plate 를 IncuCyt ZOOM® 에 넣고 scanning 전에 37°C 에서 30 분간 warming 합니다.

- a. Objective: 4x, 10x, 20x
- b. Channel selection: Phase + Red, Green Fluorescence
- c. Scan interval: 2 시간 간격

5. 18-21 시간 후에 full media 로 교체하고 72 시간 또는 cell 이 전체적으로 꼭 찰 때까지 scanning 합니다.

**Figure 3. Optimization protocol**



**Calculation** Required volume of IncuCyt™ NuLight™ BacMam 3.0 Reagent = Final volume of cell seeding suspension required X  $\frac{\text{BacMam percentage}}{100}$

**Example** 최종부피 2 mL 에 2% (v/v) transduction 을 하기 위해서는 0.04 mL 의 IncuCyt™ NuLight™ BacMam 3.0 시약 필요.



**Transduction Efficiency 와  
Toxicity 평가**

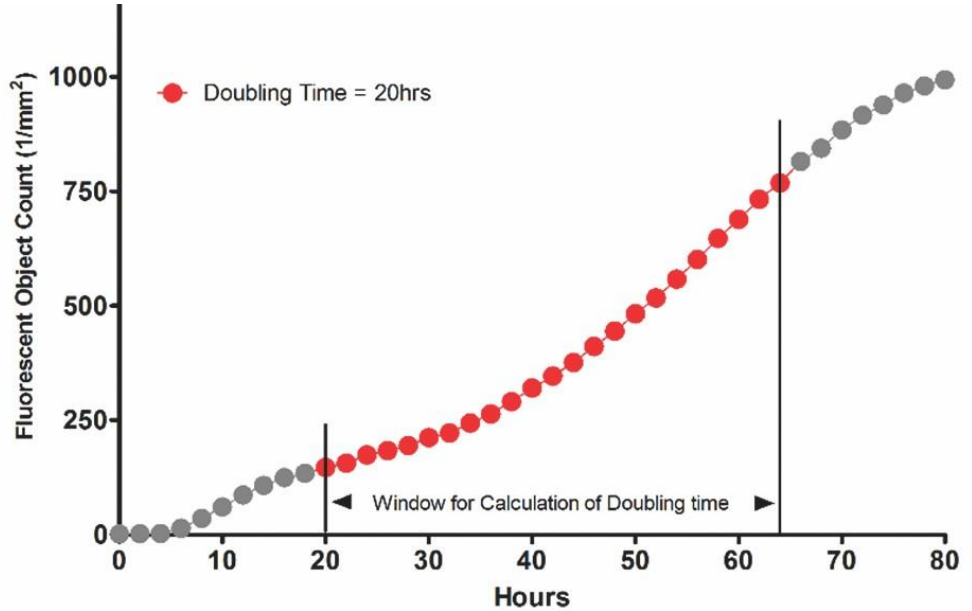
Cytotoxicity 없이 높은 transduction efficiency 를 얻기 위해서는 IncuCyte™ NuLight™ BacMam 3.0 시약을 최적농도로 사용해야 합니다.

**Transduction Efficiency**  
IncuCyte ZOOM® system image 와 Red/Green Object Count 를 이용하여 시간 경과에 따른 NuLight™ BacMam 3.0 시약의 각 농도별 발현 차이를 비교합니다. 이 중에서 transduction 이 가장 많이 일어나고 형광 발현이 가장 오래 지속된 농도를 결정합니다.

**Toxicity**  
IncuCyte ZOOM® system image 와 Confluence metrics 를 이용하여 NuLight™ BacMam 3.0 시약의 각 농도에서 cell morphology 와 growth rate 를 uninfected control 과 함께 비교합니다. 이 중에서 control 대비 cell morphology와 growth rate 가 크게 차이 나지 않는 농도를 결정합니다.

**Note:** 만약 optimization 후 초기 cell seeding density 를 변경하고자 한다면 IncuCyte™ NuLight™ BacMam 3.0 시약의 농도를 비례적으로 적용할 수 있습니다.

예를 들어, 2000 개의 cell 에 2%의 NuLight™ BacMam 3.0 시약이 최적농도라고 한다면, 4000 개의 cell 에는 4%의 NuLight™ BacMam 3.0 시약이 최적농도입니다.



**Figure 4. IncuCyte™ NuLight™ BacMam 3.0 시약으로 형광 표지된 HT-1080 cell 의 proliferation.** HT-1080 cell 을 96-well plate 에 2,000 cells/well 로 seeding 하고 2% (v/v) NuLight™ Red BacMam 3.0 Reagent 시약으로 infection. IncuCyte ZOOM® system object count를 이용하여 infection 후 20h 때(log phase)부터의 cell doubling time 을 계산(highlighted red). 20h 부터 64h 까지 형광발현의 급격한 증가가 관찰.

**Calculating Doubling Times**

Cell 의 doubling time 은 핵의 형광발현이 최대로 된 상태(일반적으로 treat 후 20 시간)의 log phase 에서 계산되어야

합니다. 이 때 형광발현은 72 시간 이상 지속되어야 합니다.

**Licenses and Warranty**

Essen BioScience warrants that this product performs as described on the product label and in all literature associated with the sale of said product when used in accordance with the described protocol. This limited warranty is the sole warranty. No other warranties exist that extend beyond this warranty, either expressed or implied. Essen BioScience disclaims any implied warranty of merchantability or warranty of fitness for a particular purpose. Essen BioScience disclaims any responsibility for injury or damage and shall not be liable for any proximate, incidental or consequential damages in connection with this product.

If it is proven to the satisfaction of Essen BioScience that this product fails to meet performance specifications, Essen BioScience's sole obligation, at the option of Essen BioScience, is to replace the product or provide the purchaser with credit at or below the original purchase price. This limited warranty does not extend to anyone other than the purchaser. Notice of suboptimal performance must be made to Essen BioScience within 30 days of receipt of the product.

This Essen BioScience product contain proprietary nucleic acid(s) coding for proprietary fluorescent protein(s) being, including its derivatives or modifications, the subject of pending patent applications and/or patents owned by Evrogen JSC (hereinafter "Evrogen Fluorescent Proteins").

The purchase of Essen BioScience products incorporating these fluorescent proteins conveys to the buyer the non-transferable right to use Evrogen Fluorescent Proteins only for research conducted by the buyer. No rights are conveyed to modify or clone the gene encoding fluorescent protein contained in this product or to use Evrogen Fluorescent Proteins for commercial purposes. The right to use Evrogen Fluorescent Proteins specifically excludes the right to validate or screen compounds for commercial purposes. For information on commercial licensing, contact Evrogen Licensing Department, email: license@evrogen.com.