

動物培養細胞用 細胞増殖・毒性試験システム

『細胞の』ATP 測定試薬 Ver.2

取扱説明書

目次

	ページ
I. 本システムの概要	2
II. 製品構成	2
III. 『細胞の』ATP 測定試薬 Ver.2 の保存方法	3
IV. 『細胞の』ATP 測定試薬 Ver.2 のプロトコール	3
V. 測定結果に関して	4
VI. 参考データ	5
VII. トラブルシューティング	7
VIII. 使用上のご注意	9



東洋ビーネット株式会社

人と科学のステキな未来へ

コスモ・バイオ株式会社

2018.02

I. 本システムの概要

『細胞の』ATP測定試薬 Ver.2は、培養細胞中のアデノシン三リン酸(ATP)量をホタル・ルシフェラーゼ発光法で測定する動物細胞用の細胞増殖・毒性試験用試薬です。細胞内のATP量は、細胞生存性と相関関係があり、生細胞数の指標となります。ルシフェラーゼ発光でATP量を測定する方法は、同じく呼吸系代謝を利用した生細胞検出発色方法と比べ、非常に高感度な測定法であるため、少ない細胞数から培養試験を開始できます。さらに、培養初期の細胞数が少ない日数から細胞数の変化を測定することが可能となります。

ホタル・ルシフェラーゼ発光反応は、ルシフェラーゼによるルシフェリンの酸化反応を通して光を生じます。ルシフェリンは、ルシフェラーゼ、マグネシウムイオン(Mg²⁺)存在下において、ATPと反応した後、酸素分子(O₂)と反応して励起状態のオキシルルシフェリンを生成し、基底状態に戻る際に光を発します。ルシフェラーゼ発光反応は、ATPが必須因子であるため、生じる発光量はATP量に比例します。(図1)

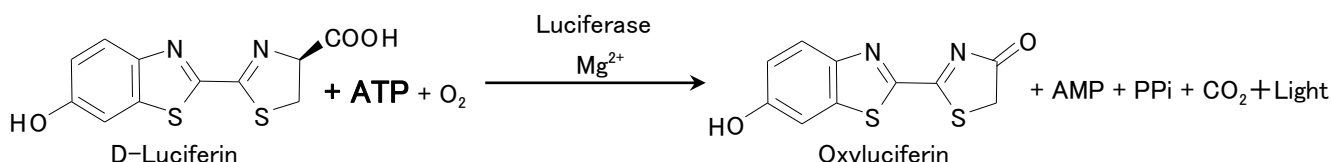


図1. ホタル・ルシフェラーゼ発光反応機構

『細胞の』ATP測定試薬 Ver.2は、ルシフェリンとルシフェラーゼの反応を制御する試薬構成を独自に開発したことにより、接着細胞と浮遊細胞ともに発光の安定性が高く、さらに、試験化合物を溶解させるための溶媒の影響も考慮した仕様となっています。細胞溶解剤とルシフェラーゼ発光試薬が1液となっており、培養プレートに発光試薬を直接添加することにより細胞溶解が開始され、試薬添加10分後から測定ができる簡便性と迅速性に優れています。少数検体から多検体測定まで広い使用環境に適した製品です。

『細胞の』ATP測定試薬 Ver.2では、試薬組成を工夫することにより製品の耐熱性を大幅に向上させました。そのため、アッセイ時間が長時間にわたるハイスループット・スクリーニングにおいても試薬の性能が低下することがありません。

II. 製品構成

製品名	メーカーコード	構成	保存条件
『細胞の』ATP測定試薬 Ver.2 10 ml	CA2-10	・発光試薬(凍結品) 10ml × 1本	-20°C 遮光
『細胞の』ATP測定試薬 Ver.2 50 ml	CA2-50	・発光試薬(凍結品) 50ml × 1本	-20°C 遮光
『細胞の』ATP測定試薬 Ver.2 1,000 回用	CA2-100	・発光試薬(凍結品) 50ml × 2本	-20°C 遮光
『細胞の』ATP測定試薬 Ver.2 10,000 回用	CA2-1000	・発光試薬(凍結品) 50ml × 20本	-20°C 遮光



Ⅲ. 『細胞の』ATP 測定試薬 Ver.2 の保存方法

1. 『細胞の』ATP 測定試薬 Ver.2 は凍結品です。
本試薬を受け取られた後は、ただちに-20℃で遮光保存してください。
2. 『細胞の』ATP 測定試薬 Ver.2 は、-20℃にて遮光保存し、製品に記載された使用期限内に使用してください。
3. 『細胞の』ATP 測定試薬 Ver.2 は、凍結融解を繰り返すと、試薬の発光性能が低下することがあります。1度の測定で使い切らない場合は、最初の試薬解凍時に必要量ずつ小分けにして、-20℃で遮光保存し、凍結融解をできるだけ避けることをお勧めします。(試薬 1ml は、96 ウェルプレートの場合 10 ウェル測定分、384 ウェルプレートの場合 40 ウェル測定分に相当します。)
また、検体の測定ごとに、同濃度の ATP 溶液を用いて、試薬の発光活性を確認することをお勧めします。
1 回目の解凍時における発光量に対して、相対値が 15%以上低下する場合は、試薬の劣化が考えられます。この場合は、新しい『細胞の』ATP 測定試薬 Ver.2 を使用してください。

Ⅳ. 『細胞の』ATP 測定試薬 Ver.2 のプロトコール

96 ウェルプレートに、100μl/well で細胞を播種します。(25μl/well for 384 well plates) (※1)
37℃ 5% CO₂ 下で培養します。(※2)

1. 『細胞の』ATP 測定試薬 Ver.2 を4℃または室温で、遮光下にて解凍し、測定前に室温に戻します。
(※3)(※4)
2. 解凍後、試薬瓶をゆっくり数回逆さにしてよく混合します(解凍の過程で生じた試薬成分の偏りを均一化します)。(※5)
3. 試薬添加 30 分前に、培養プレートを室温に静置し、培地を室温に戻します。
4. 『細胞の』ATP 測定試薬 Ver.2 を 96 ウェルプレートに 100μl ずつ加えます。(25μl/well for 384 well plates) (※6)、(※7)
5. マイクロプレートシェーカーで 1 分間攪拌します。
6. プレートを 23℃に温度設定したルミノメーターの中で 10 分間静置します。(※8)(※9)
7. 23℃に温度設定したルミノメーターで発光量の測定を行います。(※9)

<注意事項>

- ※1 クリアボトムプレートを推奨します。(底面は無色透明平底、側面は白色不透明、細胞培養表面処理済み。)
- ※2 細胞増殖試験における培養方法および、細胞毒性試験における試験化合物の添加ならび培養方法は、お客様の培養条件で行ってください。
- ※3 本製品を直ちに使用したい場合は 37℃で解凍することが可能です。その場合、試薬の解凍が完了したらすぐに室温に戻してください。解凍後、使用しない残りの試薬は、-20℃で遮光保存してください。
- ※4 試薬への ATP の混入を防ぐために、プロトコールの全操作に渡って、手袋およびマスクの着用をお勧めします。
- ※5 混合の際、ボルテックスミキサー等を用いた激しい攪拌は避けてください。
- ※6 培地除去、細胞洗浄は不要です。
- ※7 本試薬は光に敏感です。直射日光が当たる所や蛍光灯の真下での作業は控えてください。
- ※8 プレートを 23℃に温度設定したルミノメーターの中で 10 分間静置することにより、プレート内の温度がルミノメーター内の温度と平衡化されます。(プレートを室温に 10 分間静置した時に比べ、発光の安定性がさらに向上します。)
- ※9 お使いのルミノメーターの機種によっては、ルミノメーターの温度を 24℃または 25℃に設定することにより、試薬の 10 分間静置後からの発光の安定性がさらに向上します。

測定結果に関する対処方法は、4 ページⅤ. 測定結果に関して、および 7 ページⅦ. トラブルシューティングを参照してください。



V. 測定結果に関して

A. 発光量が低い場合

非常に少量の ATP を測定する場合は、測定した検体の発光量からバックグラウンドシグナルを差し引くことが重要となります。バックグラウンドシグナルは、プレート、培地、試薬および、ルミノメーターから検出されます。バックグラウンドシグナルは、以下の操作から求めてください。

1. 細胞を播種していない培地のみが入ったウェル(100 μ l/well for 96 well plates, 25 μ l/well for 384 well plates)を準備します。
2. 検体と同様に培養します。
3. 培地と同量の『細胞の』ATP 測定試薬 Ver.2 を、検体と同様にウェルに加えます。
4. ルミノメーターで発光量を測定します。

バックグラウンドシグナルは、「0」と測定されることはありません。正確に測定を行うためには、測定ごとに、バックグラウンドシグナルを測ることをお勧めします。

B. 発光量が高い場合

測定する細胞数が多い場合は、前もってルミノメーターで直線性が得られる範囲を確認してください。ルミノメーターが持つ測定可能範囲は、ATP 溶液の段階希釈液を用いて決定することができます。(ATP 溶液の段階希釈液作成方法の詳細は、下記を参照してください。) 各 ATP 濃度の希釈液の発光量を測定し、直線性が失われ頭打ちになった値の桁数を確認してください。検体を用いた測定において、直線性が失われた桁数の数値が表示されている場合は、ルミノメーターで直線性が得られる範囲を超えている場合が考えられます。この場合は、検体中の ATP 量が多過ぎるので、培養開始細胞数または培養日数を減らして再測定してください。

★ルミノメーター測定レンジの確認方法の例

1. 1mM ATP 溶液(10mM HEPES pH7.75)を調製します。(※1)
2. ATP 溶液の 10 倍希釈系列(10^{-4} M \sim 10^{-10} M) を室温に戻した血清を含んでいない培養培地で調製します。
3. 段階希釈した ATP 溶液をプレートに分注します。(100 μ l/well for 96 well plates, 25 μ l/well for 384 well plates)
4. 各ウェルに ATP 溶液と等量の『細胞の』ATP 測定試薬 Ver.2 を加えます。
5. マイクロプレートシェーカーで 1 分間攪拌します。
6. プレートを 23 $^{\circ}$ C に温度設定したルミノメーターの中で 10 分間静置します。(※2)
7. 23 $^{\circ}$ C に温度設定したルミノメーターで測定を行います。
8. ATP 濃度と発光量の対数グラフを作成します。

※1 ATP 溶液および試薬への、外部からの ATP の混入を防ぐために、プロトコールの全操作に渡って、手袋およびマスクの着用をお勧めします。

※2 測定条件、測定方法は、実際の検体を測定する場合と同一にしてください。



VI. 参考データ

A. 細胞数と発光量の相関

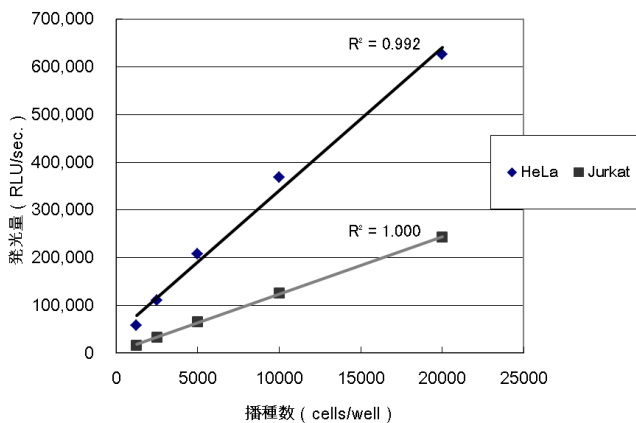


図 1. 96well プレートにおける細胞数測定

2 倍希釈系列に調製した各細胞を分注し(100 μ l/well)、4 時間培養後、等量の『細胞の』ATP 測定試薬 Ver.2 を加え、ルミノメーターで測定(n=3)。

※Jurkat(RPMI1640+10%FBS)

※HeLa(MEM+10%FBS+1%NEAA)

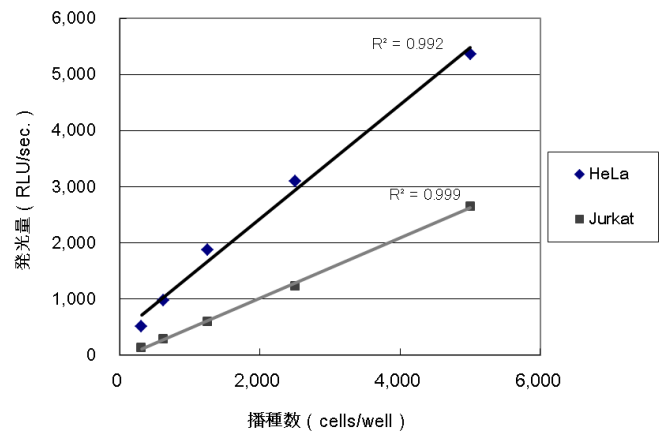


図 2. 384well プレートにおける細胞数測定

2 倍希釈系列に調製した各細胞を分注し(25 μ l/well)、4 時間培養後、等量の『細胞の』ATP 測定試薬 ver.2 を加え、ルミノメーターで測定(n=3)。

※Jurkat(RPMI1640+10%FBS)

※HeLa(MEM+10%FBS+1%NEAA)

B. 各細胞株のカイネティクスと発光安定性

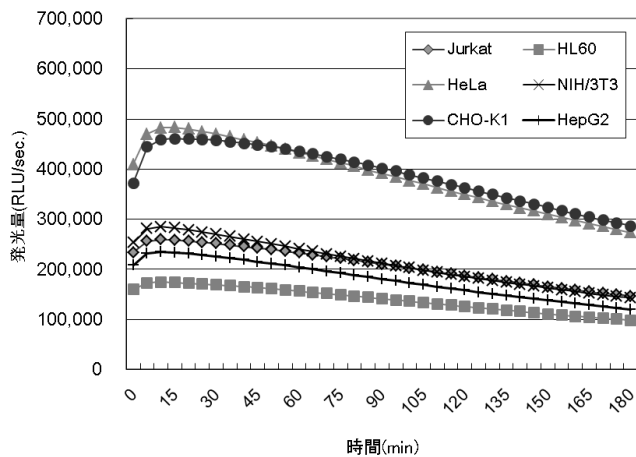


図 3. 96well プレートにおけるカイネティクス

各細胞*を 10,000 cells/well になるように分注し(100 μ l)、1 晩培養後、等量の『細胞の』ATP 測定試薬 Ver.2 を加え、ルミノメーターで測定(n=3)。

各細胞における発光半減期は、3 時間以上。

※Jurkat, HL60(RPMI1640 + 10% FBS)

※HeLa, HepG2(MEM + 10% FBS+1%NEAA)

※NIH/3T3(DMEM + 10% FCS)

※CHO-K1(HamF12 + 10% FBS)

C. 有機溶媒の影響

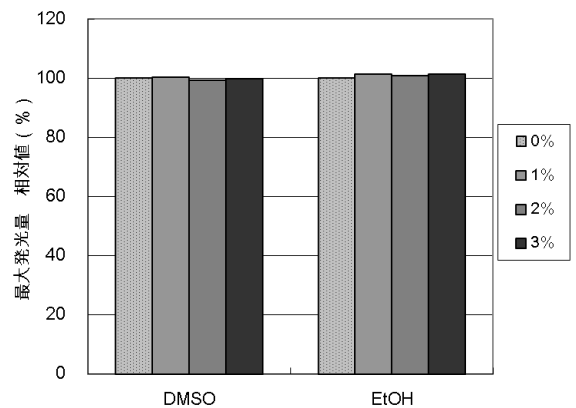


図 4. 96well プレートにおける有機溶媒の影響

各濃度の溶媒を含んだ DMEM 培地で ATP 溶液 (1.E-6M)を調製し、各ウェルに 100 μ l ずつ分注。等量の『細胞の』ATP 測定試薬 Ver.2 を加えた後、ルミノメーターで測定(n=3)。グラフは、溶媒無添加時の最大発光量に対する相対値で表示。添加量 3%以内では、最大発光量にほとんど影響を及ぼさなかった。



D. 試薬の室温安定性(23°C)

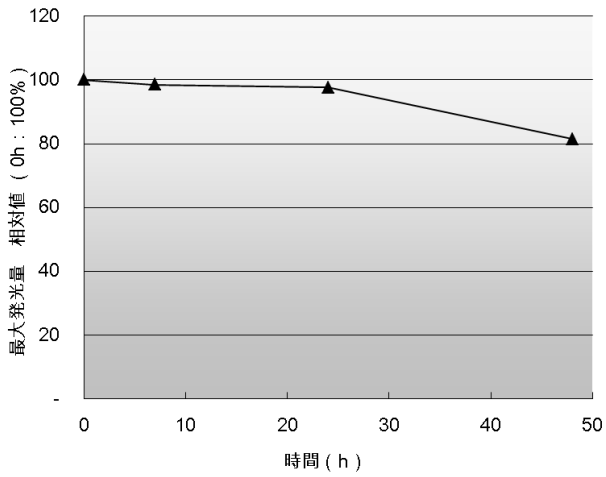


図 5. 室温放置時間と発光量の関係

DMEM 培地で ATP 溶液(1.E-6M)を調製し、96well プレートに 100 μ l ずつ分注。室温放置後の『細胞の』ATP 測定試薬 Ver.2 を等量加え、ルミノメーターで測定(n=3)。グラフは、室温放置前(0h)の最大発光量に対する相対値で表示。

E. 試薬の加温安定性(37°C)

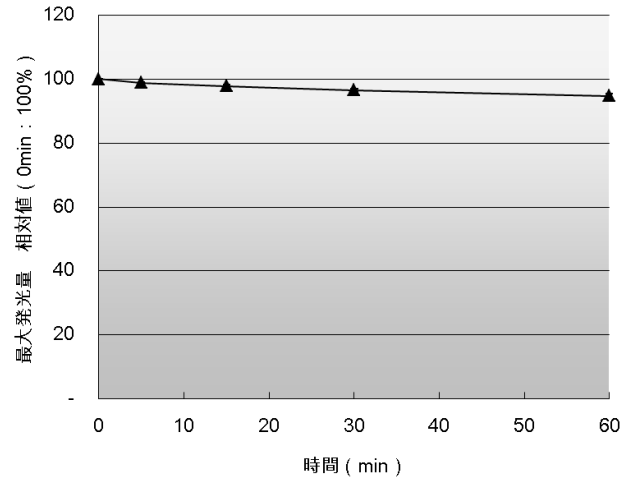


図 6. 加温時間と発光量の関係

DMEM 培地で ATP 溶液(1.E-6M)を調製し、96well プレートに 100 μ l ずつ分注。加温後の『細胞の』ATP 測定試薬 Ver.2 を等量加え、ルミノメーターで測定(n=3)。グラフは、加温前(0min)の最大発光量に対する相対値で表示。



Ⅶ. トラブルシューティング

原因の順番に関しては、『細胞の』ATP 測定試薬 Ver.2 のプロトコルの順序に従い記載しています。まず、試薬や使用機器に起因する問題を確認し、次に、培養条件などのお客様による実験条件の最適化を行ってください。

問題	原因	解決法
発光しない。または、発光量が低い。	黒色プレートを使用している。	黒色プレートは発光を吸収するため、全体の発光量を下げます。クリアボトムプレートの使用を推奨します。(底面は無色透明平底、側面は白色不透明、細胞培養表面処理済み。)
	細胞がウェルに播種されていない。または、細胞が死滅している、細胞数が少ない。	① クリアボトムプレートを使用している場合は、顕微鏡で細胞を播種していることおよび、細胞が生存していることを確認してください。 ② 培養開始時の播種する細胞数を増やしてください。 ③ 測定した検体の発光量からバックグラウンドの値を差し引いてください。(4 ページ V. A. を参照)
	試薬が劣化している。	試薬保存状態により、試薬の劣化が起こっている場合があります。 ① ATP 溶液を用いて、試薬の発光活性を確認してください。 ② 凍結融解を繰り返さないでください。最初の解凍時に、必要量ずつ分注しておくことをお勧めします。(2 ページ III. を参照)
	試薬が室温に戻っていない。	ルシフェラーゼ発光反応は、温度によって大きく影響されます。試薬をプレートに加える前に、試薬が室温に戻っていることを確認してください。
	使用している測定機器において、発光測定機能がついていない。	ルミノメーターおよび、発光測定ができるマイクロプレートリーダーをお使いください。機器の測定設定につきましては、機器の取扱い説明書をお読みください。
	1 検体あたりの測定時間(積算時間)が短い。	測定感度は、使用しているルミノメーターに依存します。1 検体あたりの測定時間(積算時間)を長く設定してください。
	測定機器の温度制御が働いていない。	ルシフェラーゼ発光反応は、温度によって大きく影響されます。ルミノメーターの設定温度を 23°C に設定してください。
バックグラウンドが高い。	測定プレートに汚れがある。	① 測定プレートに汚れ、夾雑物がないことを確認してください。 ② 試薬のみを加えたウェルの発光量を測定し、プレートに ATP が混入しているかどうかを確認してください。
	培地に ATP が混入した。	① 培地が無菌で保たれているかどうかを確認してください。 ② 培地のみを加えたウェルに、試薬を添加し、発光量を測定してください。試薬のみを加えたウェルの測定値に対して、顕著に発光量が高い場合は、培地に ATP が混入したことが考えられます。この場合は、新しい培地に交換してください。
	試薬に ATP が混入した。	試薬のみを加えたウェルを測定し、発光量を確認してください。何も加えていないウェルの測定値(ルミノメーターのバックグラウンドシグナル)に対して、発光量が顕著に高い場合は、試薬に ATP が混入したことが考えられます。この場合は、新しい『細胞の』ATP 測定試薬 Ver.2 を使用してください。
	測定機器の自動分注機および、分注チューブ、試薬ボトルに ATP が残存している。	ルミノメーターに装着された自動分注機を使用しており、ATP を多量に含むルシフェラーゼアッセイ用試薬などと共通にお使いの場合は、ATP が分注チューブ内などに残存することがあります。 ① 使用機器の取扱い説明書に従い、洗浄操作をやり直してください。 ② 分注チューブや試薬ボトルなどは、新しい物に交換してください。 ③ 分注チューブや試薬ボトルなどは、ルシフェラーゼアッセイ用試薬などと、共用しないでください。
	発光量が高い。または、ルミノメーターの測定可能範囲を超えている。	① クリアボトムプレートを使用している場合は、顕微鏡で細胞がコンフルエント、オーバーコンフルエント状態になっていないことを確認してください。 ② 細胞がコンフルエントになっていた場合は、播種する細胞数を減らすか、培養日数を減らしてください。 ③ 発光強度が高いと、ルミノメーターで直線性が得られる範囲を超えている場合があります。ATP 溶液を用いて、ルミノメーターで直線性が得られる範囲を確認してください。(4 ページ V. B. を参照)



	プレート内の培地が室温に戻っていない。	ルシフェラーゼ発光反応は、温度によって大きく影響されます。試薬を加える前に、測定プレートを 30 分間室温に静置し、培地が室温に戻っていることを確認してください。
	1 検体あたりの測定時間(積算時間)が長い。	測定感度は、使用しているルミノメーターに依存します。1 検体あたりの測定時間(積算時間)を短く設定してください。
	測定機器の温度制御が働いていない。	ルシフェラーゼ発光反応は、温度によって大きく影響されます。ルミノメーターの設定温度を 23℃に設定してください。
測定値がばらつく。または、再現性がとれない。	細胞数が多い。	セミコンフルエントまでの細胞増殖において、発光量の測定を行ってください。コンフルエントおよび、オーバーコンフルエントで測定を行った場合は、正しく測定されない可能性があります。
	細胞数が少ない。	発光量が低い場合は、バックグラウンドとの S:N 比が取り難く、値がばらつきます。測定時間を長くするなどの測定条件を検討してください。
	細胞の状態が異なる。	継代時における細胞の密度、継代回数などにより、試薬に対する細胞の反応性が変化する場合があります。できる限り新鮮な細胞を用いて、同一の実験条件下で測定を行ってください。
	細胞種が異なる。	細胞種が異なると、試験化合物への反応性および、細胞内の ATP 量も異なり、試薬に対する細胞の反応性も変化します。再現性を得るためには、同一の細胞株で実験を行ってください。
	播種後から測定までのタイミングが異なる。	播種後から細胞は増殖します。よって、播種する時間や毎日の測定を開始する時間を決めておくと再現性は高くなります。また、播種後から試験化合物を添加するまでの培養時間および、添加後から測定までの培養時間もそろえる必要があります。
	試薬が劣化している。	試薬保存状態により、試薬の劣化が起こっている場合があります。 ① ATP 溶液を用いて、試薬の発光活性を確認してください。 ② 凍結融解を繰り返さないでください。最初の解凍時に、必要量ずつ分注しておくことをお勧めします。(3 ページⅢ. を参照)
	培地量と試薬量が等量でない。	『細胞の』ATP 測定試薬 Ver.2 は、培地量に対して等量の試薬を加えた場合に、安定した発光を示します。96 ウェルプレートをご使用の場合は 100μl、384 ウェルプレートをご使用の場合は 25μl、培地および試薬を加えてください。
	解凍時に試薬成分がよく混ざっていない。または、試薬と培地がよく混ざっていない。	① 試薬を解凍後、試薬瓶をゆっくり数回逆さにしてよく混合します。 ② 試薬を添加する際、培養培地は除去しないでください。 ③ 培地に添加する試薬のスピードは、できるだけそろえてください。 ④ 試薬は培地に直接加えてください(ウェルの壁伝えに添加しないで下さい)。 ⑤ マイクロプレートシェーカーでの 1 分間の攪拌は、必ず行ってください。
	試薬を添加後から測定までのタイミングが異なる。	試薬添加後から測定を開始するまでの時間は、実験条件によって異なりますので、高い再現性を得るために、試薬添加後から測定を開始するまでの時間は、毎回そろえて行うことをお勧めします。
試薬添加後に発光量のずり上がりが生じる。	お使いになっているルミノメーターの機種によっては、細胞種や細胞数により、試薬添加後、発光が安定するまでに 10 分以上必要な場合があります。 ① 試薬添加後、発光を安定化させるために、23℃に温度設定したルミノメーターの中で 10 分間の静置は必ず行ってください。 ② ①を行っても試薬添加後の発光量の増加傾向が認められる場合は、ルミノメーターの設定温度を 23℃から 24℃または 25℃に変更し、発光の立ち上がりを早くすることにより、発光を安定化させてください。 ③ ②を行っても試薬添加後の発光量の増加傾向が認められる場合は、各温度設定されたルミノメーターの中で 10 分以上静置してください。	
測定機器の測定条件が異なる。	ルシフェラーゼの発光反応(最大発光量&発光継続時間)は、温度によって大きく影響されます。高い再現性を得るためには、ルミノメーターの設定温度および、測定条件を毎回同一にしてください。	



VIII. 使用上のご注意

- ご使用前に必ず安全データシート(SDS)をお読みください。
- 本製品を研究用途以外には使用しないでください。
- 日本国内のみで使用してください。
- 使用期限と保存条件を必ず守ってください。
- 本製品を火気に近づけないでください。
- 本製品の廃棄は、お客様の施設の廃棄ルールに従って処分してください。
- 本製品に使用する他の試薬・器具・機械は、使用前に必ず各々の使用説明書をよく読み、その指示に従って調整・準備を行ってください。
- 本製品に使用する他の試薬・器具は必ず滅菌してください。
- 材質によっては、試薬の付着により腐食・変色する場合がありますので、試薬が付着した器具・機械は蒸留水でよく洗浄してください。
- 試薬類を誤って飲み込んだ場合は、応急処置として水を飲ませ、直ちに医師の診断を受けてください。
- 手袋、保護用メガネ等により適切な身体保護を施し、試薬類の身体への接触を避けてください。万一、試薬類が目に入ったり、皮膚に付着した場合は、応急処置として水で洗い流し、直ちに医師の診断を受けてください。
- その他、ご不明な点がございましたら、下記問い合わせ先までご連絡ください。(9:00～17:30)

お問い合わせ先

東洋ビーネット(株)バイオプロダクツ部
〒104-0031 東京都中央区京橋二丁目2番1号
TEL:03-3272-1954 FAX03-3272-8276
E-mail: bio@toyo-b-net.co.jp
HP: <http://www.toyo-b-net.co.jp/>

