

三次元培養 動物細胞用 細胞増殖・毒性試験

『塊の』ATP 測定試薬® Ver2.1

(KA2.1-10 KA2.1-50 KA2.1-100 KA2.1-1000)

取扱説明書

I. 試薬の概要	2
II. 製品構成	2
III. 使用方法	3
IV. 参考データ	4
V. トラブルシューティング	6
VI. 使用上の注意	7

保存温度	-80°C
使用期限	外箱に記載

I. 試薬の概要

『塊の』ATP 測定試薬® Ver2.1「KA2.1」は、スフェロイド培養した細胞等、塊状の動物培養細胞から速やかにアデノシン三リン酸(ATP)を抽出し、抽出した ATP 量をホタル・ルシフェラーゼ発光法により測定する試薬です。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るため、細胞増殖・毒性試験に用いることができます。本試薬を用いたルシフェラーゼ発光法による ATP 量の測定は、同じく呼吸系代謝を利用した生細胞検出发色法と比較して非常に高感度であるため、少ない細胞数から培養試験を開始できます。

<本試薬の特徴>

- * 培養プレートに試薬を直接添加するだけで測定可能(1ステップ)
- * 試薬添加後、10分で測定可
- * 少数検体から多検体測定まで幅広く適応

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を通して光を生じる反応です。ルシフェリンは、ルシフェラーゼ、マグネシウムイオン(Mg²⁺)の存在下において ATP と反応した後、酸素(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生します(図1)。

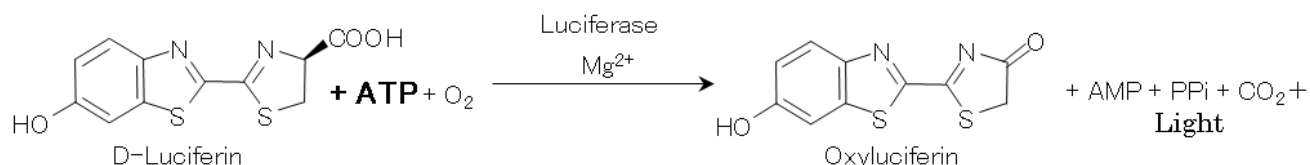


図1. ホタル・ルシフェラーゼ発光反応機構

II. 製品構成

		『塊の』ATP 測定試薬® Ver2.1			
		10ml (KA2.1-10)	50ml (KA2.1-50)	100ml (KA2.1-100)	1000ml (KA2.1-1000)
構成	『塊の』ATP 測定試薬® Ver2.1 (10ml)	1本	—	—	—
	『塊の』ATP 測定試薬® Ver2.1 (50 ml)	—	1本	2本	20本

Ⅲ. 使用方法

☞ 試薬への ATP の混入を防ぐため、全操作に渡り、手袋およびマスクの着用をお勧めします。

試薬の準備	
『塊の』ATP 測定試薬® Ver2.1	<p>～本試薬は、光や温度、物理的な刺激による影響を受けます～</p> <p>☞ 直射日光が当たる場所や蛍光灯の真下での作業、試薬融解時の 24℃以上でのインキュベーターや、混合時のボルテックスミキサー等を用いた激しい攪拌は避けて下さい。</p> <p>☞ 一度の測定で使い切らない場合は、凍結融解の繰り返しを避けるため、必要量ずつ小分けにして <u>-80℃で遮光保存</u> することをお勧めします。</p> <p>※96well プレートの場合 : 試薬 1ml は 10well 測定分に相当 ※384well プレートの場合 : 試薬 1ml は 40well 測定分に相当</p>

＜測定プロトコル＞	
① 細胞培養	<ol style="list-style-type: none"> 96well プレートに細胞を播種し(100 μl/well)、37℃、5% CO₂ 下で培養します。 <ul style="list-style-type: none"> ☞ スフェロイド形成用培養プレートの使用を推奨します。 ☞ 384well プレートの場合は、25 μl/well で細胞を播種します。 ☞ 培養条件は、実験目的に応じてお客様で設定して下さい。 ☞ 白色プレートまたは白色プレート(クリアボトム)を使用して下さい。
② ATP 測定	<ol style="list-style-type: none"> 室温に戻した『塊の』ATP 測定試薬® Ver2.1 100 μl を各 well に添加します。 <ul style="list-style-type: none"> ☞ 試薬は、4℃または室温にて融解して下さい。 ☞ 融解後の試薬は、転倒混和により穏やかに混和してから使用して下さい。 ☞ 培地の除去、細胞の洗浄は不要です。 プレートシェーカーを用いて、プレートを 1 分間攪拌します。 23℃に設定したルミノメーターの中で、10 分間、静置します。 ルミノメーターで発光量を測定します。

IV. 参考データ

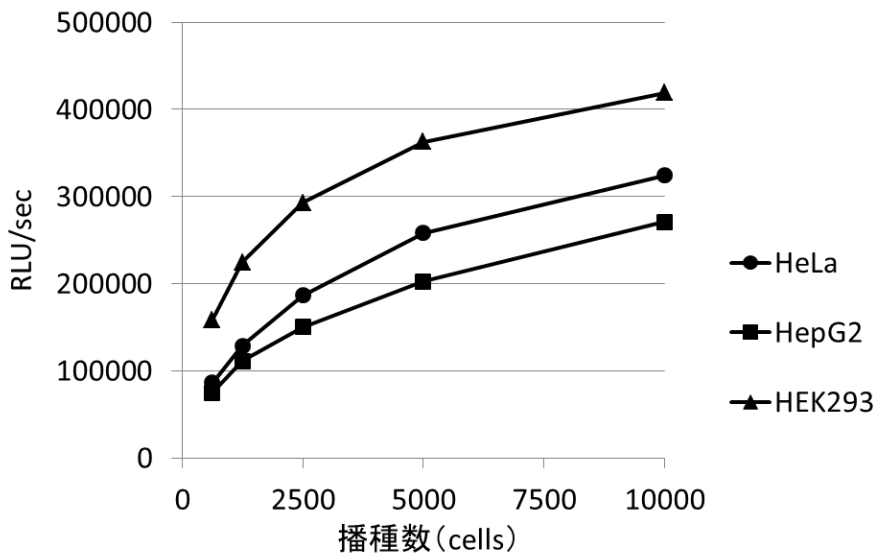


図 2. 96well(U底)プレートで培養したスフェロイドの ATP 測定

96well プレート(U底)に、625、1250、2500、5000、10000 cells/well(100 μ l/well)となるよう細胞(HeLa、HepG2、HEK293)を播種し、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下で培養。3 日後に『塊の』ATP 測定試薬[®] Ver2.1 100 μ l を添加し、発光量を測定した。

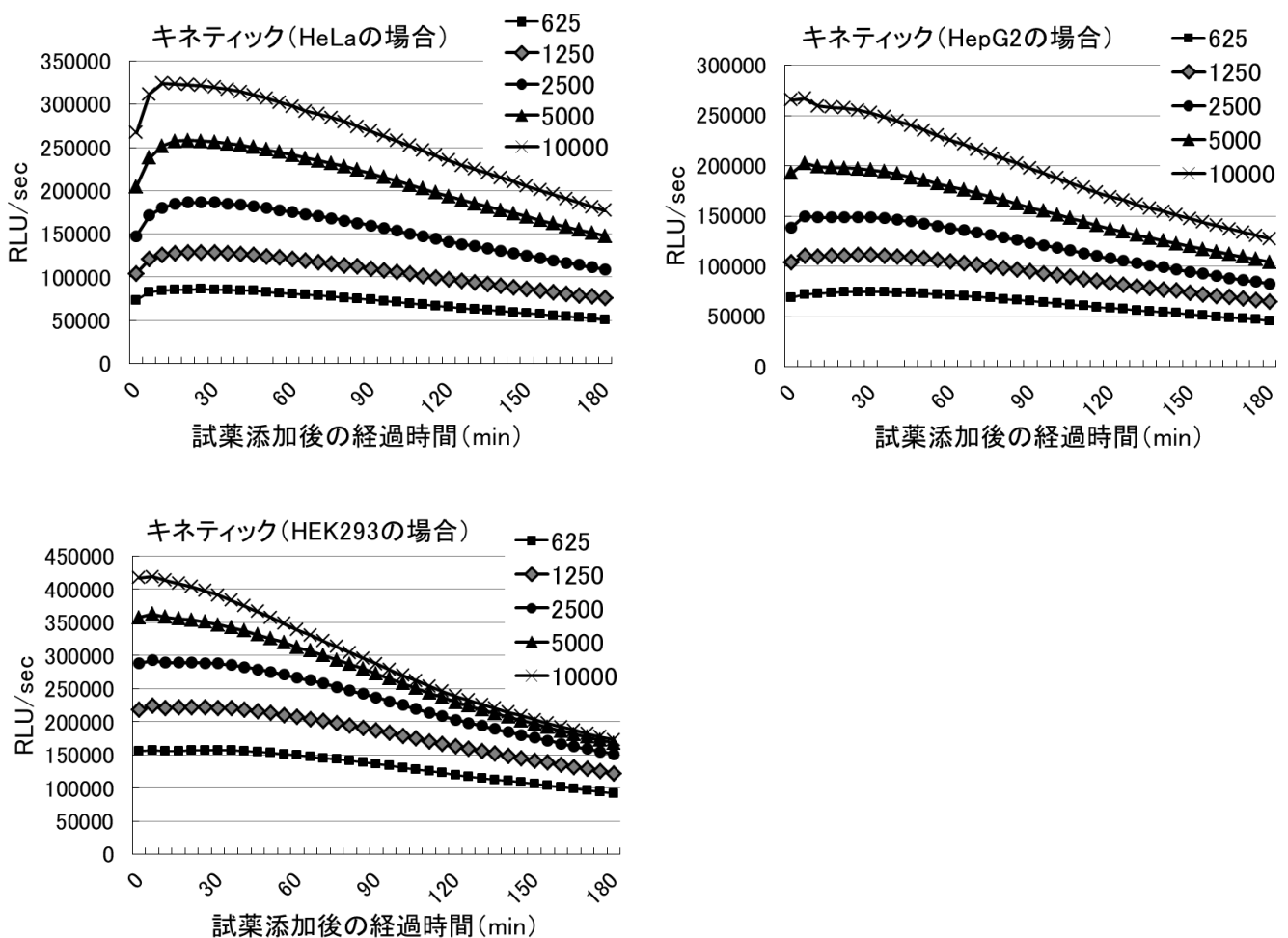


図 3. 96well(U底)プレートで培養したスフェロイドの ATP 測定
培養および測定条件は、図 2 と同様。

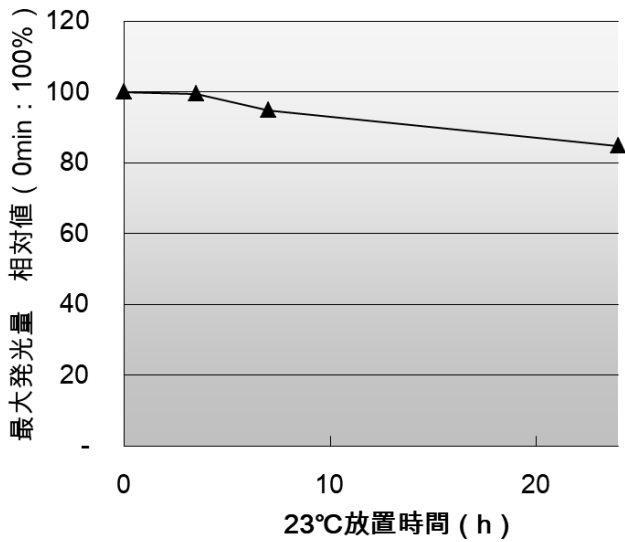


図 4. 室温放置時間と発光量の関係

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(23°C)で放置後の『塊の』ATP測定試薬® Ver2.1を等量加え、発光量を測定(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。

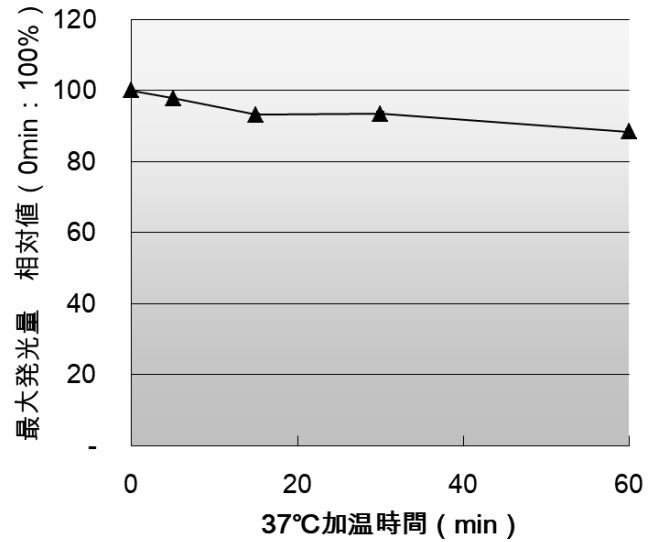


図 5. 加温時間と発光量の関係

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。37°Cで加温処理後の『塊の』ATP測定試薬® Ver2.1を等量加え、発光量を測定(n=3)。グラフは、加温処理前(0min)の最大発光量に対する相対値で表示。

V. トラブルシューティング

問題	原因	解決法
発光しない。 発光量が低い。	黒色プレートを使用している。	<ul style="list-style-type: none"> ● 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。白色プレートまたは白色プレート(クリアボトム)を使用して下さい
	細胞が播種されていない。または、細胞が死滅している。細胞数が少ない。	<ul style="list-style-type: none"> ● クリアボトムプレートを使用している場合は、顕微鏡で細胞が播種されていること、及び細胞が生存していることを確認して下さい。 ● 細胞播種数を増やして下さい。 ● 播種数が非常に少ない場合は、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いて下さい。 <p><バックグラウンド測定方法(96well プレートの場合)></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. ウェルに、培養に使用したものと同組成の培地 100 μl を入れる。 2. 等量の『塊の』ATP 測定試薬 Ver2.1 を添加し、ルミノメーターで発光量を測定する。 <p>☞測定条件・方法は、実際の検体を測定する場合と同一にして下さい。</p>
	試薬が劣化している。	<ul style="list-style-type: none"> ● 保存状態により、試薬が劣化している可能性があります。試薬の保存方法を確認して下さい(1 ページ参照)。 ● 凍結融解を繰り返さないで下さい(3 ページ: 試薬の準備 を参照)
	試薬が室温に戻っていない。	<ul style="list-style-type: none"> ● 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。試薬を添加する前に、試薬が室温に戻っていることを確認して下さい。
測定機器で設定した測定時間(積算時間)が短い。	<ul style="list-style-type: none"> ● 測定感度は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)を長く設定して下さい。 	
バックグラウンド発光量が高い。	使用器具に ATP が混入している。	<ul style="list-style-type: none"> ● 滅菌済みの器具・容器を使用して下さい。
	培養培地に ATP が混入している。	<ul style="list-style-type: none"> ● 培地が無菌状態であることを確認して下さい。
発光量が高く、ルミノメーターの測定可能範囲を超えている。	細胞数が多い。	<ul style="list-style-type: none"> ● 事前に、ルミノメーターで直線性が得られる範囲を確認して下さい。 ● 播種数を減らして下さい。 ● 培養日数を短くして下さい。
	測定機器で設定した測定時間(積算時間)が長い。	<ul style="list-style-type: none"> ● 1 検体あたりの測定時間(積算時間)を短く設定して下さい。

問題	原因	解決法
測定値のばらつきが大きい。	細胞の状態が異なる。	● 継代時の細胞密度、継代回数などにより、細胞反応性が変化する場合があります。培養条件を統一して下さい。
	播種後から測定までのタイミングが異なる。	● 播種後の実験条件は毎回統一して下さい。
	測定機器の測定条件が異なる。	● 測定条件を統一して下さい。
	融解後の試薬成分が十分に混ざっていない。	● 融解後の試薬は十分に混合してから使用して下さい。その際、ボルテックスミキサー等の激しい攪拌は避け、転倒混和等により穏やかに攪拌して下さい。

VI. 使用上の注意

- ご使用前に必ず安全データシート(SDS)をお読み下さい。
- 本製品を研究用途以外には使用しないで下さい。
- 日本国内のみで使用して下さい。
- 使用期限と保存条件を必ず守って下さい。
- 本製品を火気に近づけないで下さい。
- 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下さい。
- 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・準備を行って下さい。
- 本製品に使用する他の試薬・器具は必ず滅菌して下さい。
- 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。試薬が付着した器具・機械は蒸留水でよく洗浄して下さい。
- 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下さい。
- 手袋、保護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下さい。試薬類が目に入った場合や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下さい。
- その他、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)

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: 090-4386-0106 FAX: 03-3272-8276
E-mail: bio@toyo-b-net.co.jp
HP: <http://www.toyo-b-net.co.jp/>