

Product Manual

产品说明书

产品货号

PR01066

产品介绍

ATP 是细胞内最重要的能量分子，可以用来衡量细胞新陈代谢水平并与活细胞数目具有良好的线性关系，因此，可通过 ATP 含量反映活细胞的数目。Luminescent 细胞活力测定试剂盒 (ATP)借助 ATP 依赖的萤光素酶催化的萤光素发光反应，通过化学发光信号测定细胞内 ATP 含量（检测原理见图 1），从而检测细胞活力或定量检测活细胞数目，具有灵敏度高、线性范围宽、稳定性好的特点。

本试剂盒兼容少量样品检测以及大量样品的高通量筛选检测。96 孔板中，在 100 个至 100,000 个细胞范围内有良好的线性关系，但不同细胞的检测数量上限会有不同。此外，试剂盒中提供的检测试剂为即用型，读数稳定、检测速度快，完成检测仅需约 10 min，无需洗涤细胞也无需更换或去除培养液，相比于其他常见的细胞活力测定方法，如 Calcein-AM、CCK-8 等，发光法细胞活力检测更加简单快捷。

本产品推荐多功能酶标仪的化学模块进行检测。

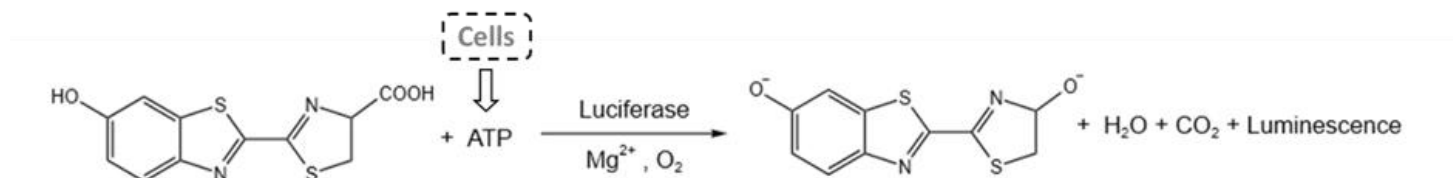


图 1 检测原理图

应用范围

细胞活力检测、高通量筛选 (High-Throughput Screening, HTS)

储运条件

-20 °C 避光保存，有效期见外包装；冰袋运输。

产品特点

灵敏度高、线性范围广：可以检测 100~100000 个范围内的细胞且呈现出良好的线性范围；

操作简单快速：即用型试剂且试剂加入后仅需 10 min 即可检测；

稳定性好：萤光属于辉光型信号稳定；

化学发光强：化学发光值更高，检测效果更好。

注意事项

- 1.使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。
- 2.试剂中含有萤光素酶，反复冻融会影响其活性。建议分装后置于 -20 °C 避光保存，分装耗材避免 ATPase 污染。
- 3.试剂及细胞样品使用前均需平衡至室温，以避免酶催化效果的影响。
- 4.药物含量较高时可能会干扰萤光素酶反应，从而影响化学发光信号。建议设置含有药物的细胞培养液对照孔以排除溶剂的干扰。
- 5.检测时需使用不透光白色或黑色的 96 孔板或 384 孔板，以避免相邻孔之间会产生干扰。
- 6.本产品仅限于科研，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品和药品，不得存放于普通住宅内。
- 7.为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

自备材料

1.耗材

1.5 mL 离心管

2.试剂

(1) ddH₂O (2) 抗荧光淬灭剂

操作步骤

1.细胞培养

(1) 使用适合进行化学发光检测的 96 孔板 (推荐使用孔和孔之间不透光的 96 孔白板或黑板), 每孔接种 100 μ L 细胞 (根据培养时间确定初始接种的细胞密度, 检测时每孔细胞数量不宜超过 10 万个), 同时设置不含细胞的培养液的孔作为阴性对照。37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养细胞。也可以设置细胞的浓度梯度, 以得到最佳的实验结果。根据需要在合适的时间加药处理细胞。

注: 若是 384 孔板做高通量筛选实验, 每孔接种 25 μ L 细胞, 具体的用量请按照不同类型的 384 孔板进行调整; 细胞数量控制在 1 万个细胞以内, 具体情况需要根据细胞类型进行铺板, 建议用多通道移液器或者自动化细胞培养系统进行接种。

(2) (可选) ATP 标准曲线的制作: 把自备的 ATP 标准溶液用 PBS 稀释成适当的浓度梯度, 96 孔板每孔加入 100 μ L 的标准品。建议 ATP 标准品浓度范围选择 10 nM~1 μ M 之间, 按 10 倍梯度稀释 (初次检测可以设置 0、10、30、100、300、1000、3000、10,000 nM 这几个浓度)。ATP 标准品溶液可以用 PBS 或者细胞培养液进行稀释, 若是细胞培养液稀释请稀释后尽快进行检测, 以避免细胞培养液中的内源性 ATPase 消化 ATP 造成 ATP 含量降低, 影响线性。

(3) (可选) ATP 标准曲线的制作: 把自备的 ATP 标准溶液用 PBS 稀释成适当的浓度梯度, 96 孔板每孔加入 100 μ L 的标准品。建议 ATP 标准品浓度范围选择 10 nM~1 μ M 之间, 按 10 倍梯度稀释 (初次检测可以设置 0、10、30、100、300、1000、3000、10,000 nM 这几个浓度)。ATP 标准品溶液可以用 PBS 或者细胞培养液进行稀释, 若是细胞培养液稀释请稀释后尽快进行检测, 以避免细胞培养液中的内源性 ATPase 消化 ATP 造成 ATP 含量降低, 影响线性。

2.细胞活力检测

(1) 融解冻存的发光法检测试剂, 并平衡至室温 (或 22 $^{\circ}$ C 恒温水浴平衡)。

(2) 取出细胞培养板, 室温平衡 10 min (或 22 $^{\circ}$ C 恒温水浴平衡, 时间不宜过长, 尽量控制在 30 min 以内)。

(3) 96 孔板每孔加入 100 μ L 检测试剂 (由于孔的边缘效应, 可能会导致发光信号不稳定, 不建议在边缘铺板); 384 孔板, 可加 25 μ L 检测试剂。

(4) 室温振荡 2~10 min, 以促进细胞的裂解。

(5) 室温放置 10 min, 使发光信号趋于稳定。

(6) 使用具有检测化学发光功能的仪器, 如多功能酶标仪。根据仪器要求设置相应的参数, 每孔的检测时间一般为 0.25~1 s, 具体需根据仪器的检测灵敏度进行适当的调整。

(7) 根据化学发光读数计算细胞的相对活力, 或根据 ATP 标准曲线计算 ATP 含量从而得出细胞的相对活力。

注: 检测效果因细胞的种类不同而异, 对于一些 ATP 含量特别高的细胞, 在细胞数量达到 100,000 以上可能会出现化学发光读数继续升高, 但丧失线性关系。

3.ATP 标准曲线展示 (图 2-图 3)

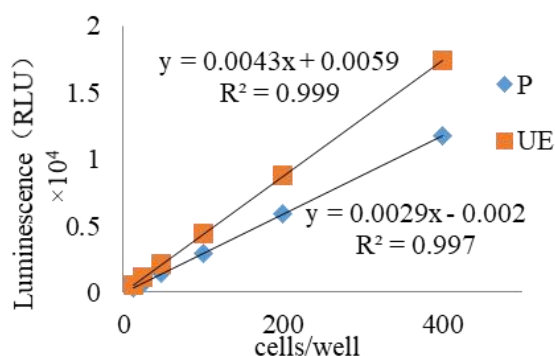


图 2 低细胞量检测效果图

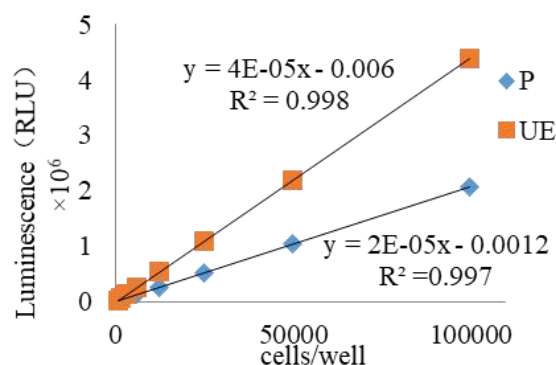


图 3 低细胞量检测效果图

在低细胞量（12~400 个细胞）和高细胞量（400~100000 个细胞）情况下 PR01066 和国外竞品 P 公司对比检测图。图 2：低细胞量检测效果图。具有良好线性结果，并且和竞品公司 P 相比，化学发光检测光亮度更强。图 3：高细胞量检测效果图。具有良好线性结果，并且和竞品公司 P 相比，化学发光检测光亮度更强。本实验测试结果是根据 HeLa 细胞为样本，不同的细胞类型和仪器类型可能存在差异，具体的情况需要具体分析。