

## Luminescent ATP Cell Viability Assay Kit II

### 产品描述

ATP是细胞内重要的能量来源，可以用于衡量细胞的新陈代谢水平。此外，ATP水平和活细胞数量成正相关。因此，ATP含量可以用于反映活细胞的数量。

ATP发光法细胞活力检测试剂盒II（Luminescent ATP Cell Viability Assay Kit II）是一种利用萤火虫荧光素酶检测细胞活力的试剂盒。本试剂盒提供高纯度的底物和含有热稳定的萤火虫荧光素酶的缓冲液。在细胞中加入本试剂使得细胞裂解，释放出ATP，然后ATP和底物可在荧光素酶催化下产生稳定的发光信号。其发光信号强度与活细胞数量成正比。

本试剂盒为ATP发光法细胞活力检测试剂盒I的冻干粉包装版本，两者的检测效果基本一致。ATP发光法细胞活力检测试剂盒I提供即用型溶液，使用更方便，但是-20°C不能长期保存。本试剂盒为冻干粉形式，使用前需要将底物溶于提供的缓冲液中，但是本试剂可在-20°C稳定保存。相比于其他检测细胞活力的试剂（如MTT、CCK-8、Alamar Blue和Calcein-AM），本试剂盒灵敏度更高，同时检测时间更短，仅需10 min即可完成检测。此外，本试剂在10-30000个细胞内具有良好的线性。经测试，本试剂盒与常见的CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay（CTG）效果相当或更优异。

### 组分和储存条件

Components	K2042-100 T	K2042-1000 T
Luminescent ATP Cell Viability Assay Substrate	1 vial	2 vials
Luminescent ATP Cell Viability Assay Buffer	10 mL	2 x 50 mL

Store the kit at -20°C away from light, stable for at least 1 year. Prepared Luminescent ATP Cell Viability Assay Reagent can be stored at -80°C away from light and stable for at least 1 year, or at -20°C away from light and stable for 6 months.

### 实验操作

- 细胞接种：**首先使用适合化学发光检测的孔板接种细胞，如白色或黑色不透明培养板。对于96孔板，每孔接种100  $\mu$ L细胞，并确保检测时每孔细胞数量在30000个以内；对于384孔板，每孔接种25  $\mu$ L细胞，并确保检测时每孔细胞数量在6000个以内。其他孔板接种数量可根据孔板大小进行调整。同时需要设置空白对照组（不含细胞，仅含培养基）。按照常规细胞培养方法培养细胞。
- 药物处理（可选）：**如有需要，可根据实验设计用感兴趣的药物处理细胞。此时建议除了空白对照，还需要设立阴性对照组（含细胞、培养基和药物溶剂）。

### 3. 检测试剂准备:

- 1) 提前将Luminescent ATP Cell Viability Assay Buffer置于4°C或室温解冻, 也可以将本试剂置于22°C水浴融化, 注意水浴温度不得超过25°C。
- 2) 提前将Luminescent ATP Cell Viability Assay Substrate平衡至室温。
- 3) 将Luminescent ATP Cell Viability Assay Buffer全部转移到含有Luminescent ATP Cell Viability Assay Substrate的小瓶中, 轻轻涡旋或颠倒数次即可得到Luminescent ATP Cell Viability Assay Reagent。

**\*Note:** 荧光素酶的活性对温度比较敏感。所以本试剂盒需要平衡至室温后才能使用。配成的 Luminescent ATP Cell Viability Assay Reagent 在每次使用前都需要轻轻颠倒数次以混匀。

### 4. 检测:

- 1) 从细胞培养箱中取出细胞培养板并在室温平衡10 min。

**\*Note:** 建议室温平衡时间不要超过 30 min。

- 2) 每孔加入与培养基等体积的Luminescent ATP Cell Viability Assay Reagent。如对于96孔板, 每孔100  $\mu$ L 培养基, 则每孔加入100  $\mu$ L的Luminescent ATP Cell Viability Assay Reagent。
- 3) 室温震板2 min, 促进细胞裂解。
- 4) 室温孵育10 min, 使得发光信号趋于稳定。
- 5) 孵育结束后, 使用带有化学发光检测模块的仪器(如多功能酶标仪)检测发光读数RLU。可以根据仪器要求设置相应参数, 一般可以将检测时间设置为0.25-1 s或者更长时间。
- 6) 根据发光读数RLU直接计算细胞的相对活力, 或根据ATP标准曲线计算出ATP的含量然后再计算细胞的相对活力。一般可使用以下公式计算细胞相对活力:

$$\text{细胞存活率}(\%) = \left[ \frac{(\text{RLU}_{\text{实验组}} - \text{RLU}_{\text{空白对照组}})}{(\text{RLU}_{\text{阴性对照组}} - \text{RLU}_{\text{空白对照组}})} \right] \times 100$$

**\*Note:** 检测效果可能会因细胞种类或状态不同而略有差异, 对于一些 ATP 含量特别高的细胞, 当细胞数量达到 30000 个后可能不会呈现明显的线性关系, 但发光读数还是会不断升高。

### 5. ATP标准曲线(可选):

- 1) 将自备的ATP标准溶液用细胞培养基稀释成一系列合适的浓度梯度。初次检测时可以设置0、1、3、10、30、100、300、1000、3000 nM系列浓度。
- 2) 96孔板中每孔加入100  $\mu$ L不同浓度ATP标准品, 随后每孔马上加入与培养基等体积的Luminescent ATP Cell Viability Assay Reagent。其他孔板加入ATP标准品和Luminescent ATP Cell Viability Assay Reagent 的量可根据孔板大小进行调整。

**\*Note:** 用培养基稀释 ATP 标准品时, 稀释后需要马上检测, 因为血清中的 ATPase 等可以消耗 ATP 的酶会降低 ATP 含量。

- 3) 室温震板2 min, 促进细胞裂解。
- 4) 室温孵育10 min, 使得发光信号趋于稳定。

5) 孵育结束后，使用带有化学发光检测模块的仪器（如多功能酶标仪）检测发光读数RLU。可以根据仪器要求设置相应参数，一般可以将检测时间设置为0.25-1 s或者更长时间。

**\*Note:** 建立 ATP 标准曲线为可选步骤，如检测细胞活力时可不建立 ATP 标准曲线。

## ■ 注意事项

1. 本试剂盒使用前需要先将底物冻干粉溶于缓冲液中配成均一溶液。如想使用即用型溶液，可选择购买 Luminescent ATP Cell Viability Assay Kit I。
2. 本试剂盒配成的 Luminescent ATP Cell Viability Assay Reagent 中含有荧光素酶，因此需要尽量避免反复冻融。经测试 Luminescent ATP Cell Viability Assay Reagent 反复冻融 5 次对其检测效果无显著影响。一般情况下，不建议对 Luminescent ATP Cell Viability Assay Reagent 进行分装因为很可能会引入 ATP 污染；如的确需要分装，分装的容器不得有 ATP 污染。
3. 配成的 Luminescent ATP Cell Viability Assay Reagent 在每次使用前都需要轻轻颠倒数次以获得均一溶液。
4. 反复冻融后 Luminescent ATP Cell Viability Assay Reagent 中可能会出现少量沉淀，可以平衡至室温并使沉淀尽量溶解。如平衡至室温仍有少量沉淀，可以离心去除后使用，不会影响检测效果。
5. 药物处理时，体系中药溶剂含量较高时可能会影响酶促反应，从而影响最终的结果。建议设置空白对照（含细胞、培养基和药物溶剂）以排除溶剂的干扰。一般来说，体系中使用 2% 以内的 DMSO、甲醇或乙醇不会影响检测结果。
6. 本试剂盒使用时建议使用白色或黑色不透明细胞培养孔板接种细胞，以免检测时相邻孔之间会产生干扰。
7. 操作说明中提供了 ATP 标准曲线的制备方法，但是一般检测细胞活力时不需要建立 ATP 标准曲线。
8. 环境中的微生物污染会引入外源 ATP 污染，从而干扰本试剂盒检测，所以使用时建议佩戴口罩和手套，并注意试验台整洁，谨慎开盖。
9. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
10. 本产品仅限于科研使用，不得用于临床诊断或治疗。

**APExBIO Technology**

**[www.apexbt.com](http://www.apexbt.com)**

7505 Fannin street, Suite 410, Houston, TX 77054.

Tel: +1-832-696-8203 | Fax: +1-832-641-3177 | Email: [info@apexbt.com](mailto:info@apexbt.com)