



アッセイプロトコル

ATP 測定

創薬研究用ヒト腎細胞

3D-RPTEC[®]

日機装株式会社

はじめに

このたびは、「3D-RPTEC」をお買い上げいただきありがとうございます。本稿は 3D-RPTEC を用いた ATP 測定のプロトコル例を示したものになります。3D-RPTEC を用いた評価のご参考になれば幸いです。

目次

| | |
|-------------------|-------|
| 1. 使用機器・試薬類..... | - 3 - |
| 2. 実施方法..... | - 3 - |
| 2-1. 事前準備..... | - 3 - |
| 2-2. 実施プロトコル..... | - 4 - |
| 3. 参考文献..... | - 6 - |
| 4. 問い合わせ先..... | - 6 - |

1. 使用機器・試薬類

以下に ATP 測定に必要な機器や試薬の一例を示しております。各施設でのご使用に合わせて適宜改変していただければと思います。

測定機器

- ・ 蛍光発光測定用マイクロプレートリーダー

測定用機材

| 製品名 | 製造 | カタログ番号 | 規格/容量 |
|--|--------------------|-----------|---------------------------|
| Nunc™ F96 MicroWell™ Black and White Polystyrene Plate | Thermo Scientific™ | 236105 | 96 Well / White |
| セルセーバーチップラック入 (広口チップ) | QSP | FG-FB205R | 200 μL / 96 本 × 10 ラック |

試薬類

| 製品名 | 製造 | カタログ番号 | 規格/容量 |
|---------------------------------------|---------|--------|---------------|
| CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay | Promega | G9681 | 10 mL |
| rATP | Promega | P1132 | 10 mM, 0.5 mL |

2. 実施方法

2-1. 事前準備

1. Celltiter-Glo 3D Reagent を 4°C 冷蔵庫で事前に一晩解凍する。
2. アッセイに必要な分の Celltiter-Glo 3D Reagent を分注しておく。
(1 ウェル 100 μL × ウェル数 + α)
3. Celltiter-Glo 3D Reagent は使用前に室温(22 – 25°C)に戻しておく。(目安: 30 分程度)

(検量線から ATP 量を算出する場合)

4. ATP 標準液 (rATP) を段階希釈する。下記に段階希釈の例を示す。
調製は 0.6 mL チューブを使用する。調製した各 rATP 溶液は、10 nmol/L ~ 1000 nmol/L の溶液を 100 μL ずつ白色プレートに添加する。

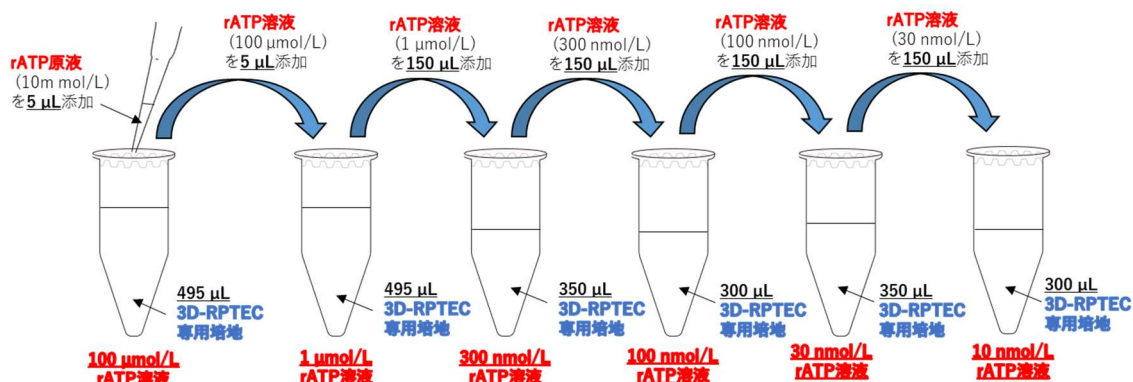


図1 rATP標準液の調製例

2-2. 実施プロトコル

1. 培養プレートから 3D-RPTEC を広口チップで培地とともに 100 μL 吸引し、下図のように白色プレート※に移す。回収漏れを防ぐため、シングルピペットの使用を推奨します。

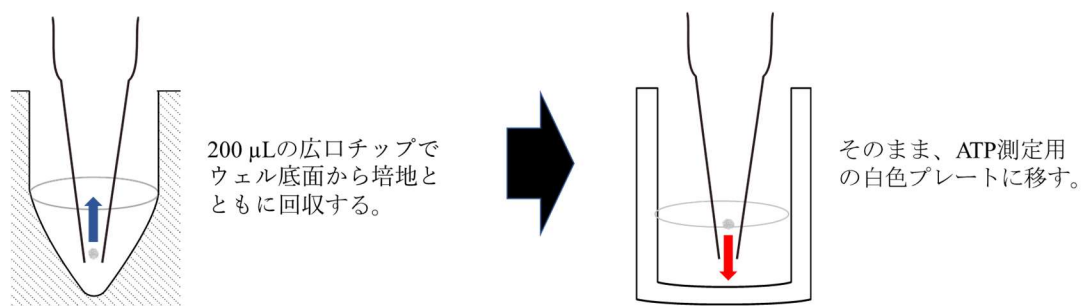


図2 3D-RPTECの移動方法

2. ブランクとして 3D-RPTEC が入っているプレートとは別の白色プレート※に培地 100 μL を添加する。
3. 検量線から ATP 量を算出する場合は、2-1.で調製した ATP 標準液 (rATP) を 3D-RPTEC が入っているプレートとは別の白色プレート※に 100 μL ずつ添加する。下図に配置例を示します。

※ 検量線の高濃度域は発光値が高いため、サンプルとは別プレートを推奨します。ブランクとともに、別プレートにて測定を行ってください。

※ 被験物質サンプルは 1 群 n=6 以上とすることで精度の良いデータを得ることができます。下図の例は n=6 で示しています。

下図に薬物評価する際の配置例を示します。レイアウトは実験条件に合わせて適宜変更してください。

Plate 1：検量線および空白用プレート、Plate 2：被験物質測定用プレート

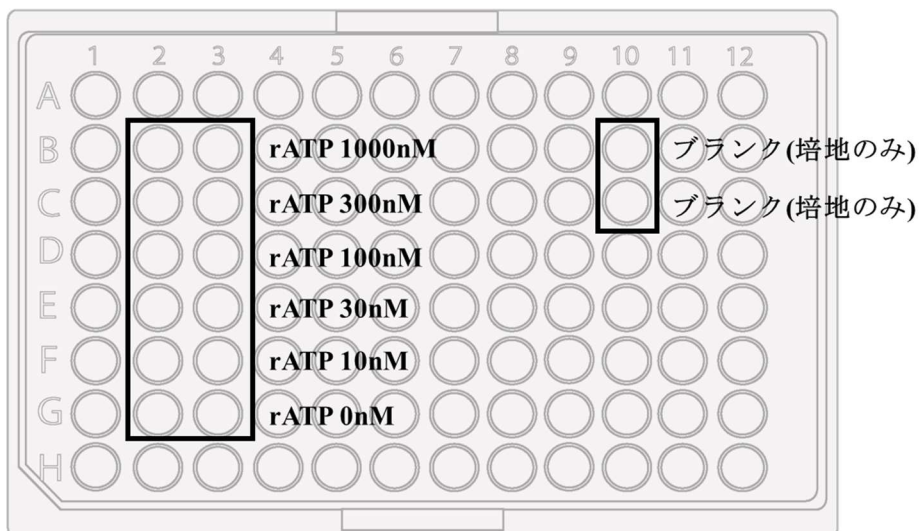


Plate 1：検量線、空白用プレート

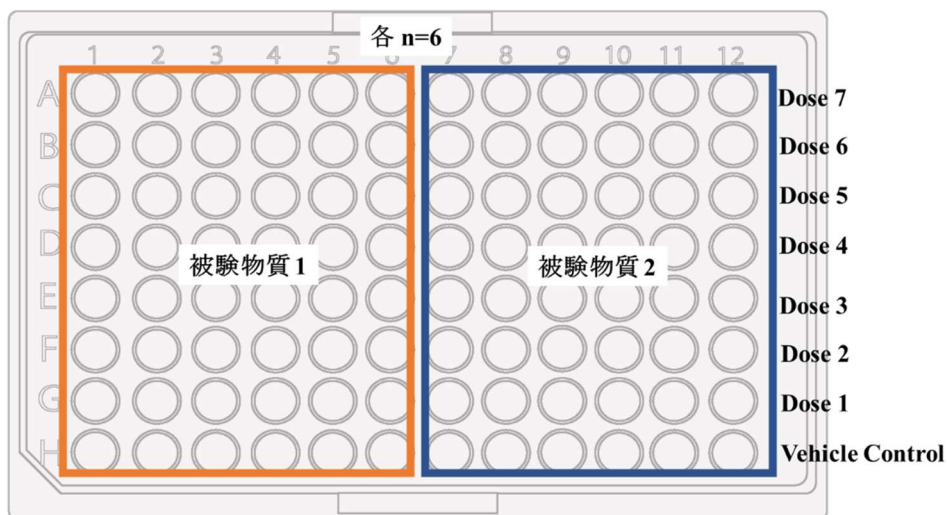


Plate 2：被験物質測定用プレート

4. 白色プレートのウェル内容量と等量（100 μ L）の Celltiter-Glo 3D Reagent を各ウェルに添加し、軽く混和する。
5. 室温(22 – 25°C)・遮光で 30 分間静置する。
6. 蛍光発光測定用マイクロプレートリーダーで発光測定を行う（積算時間：1000 msec）。

3. 参考文献

1. CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay Protocol
2. Xia, M. et al. (2008) Compound cytotoxicity profiling using quantitative high-throughput screening. Environ. Health Perspect. 116, 284–91.

4. 問い合わせ先

日機装株式会社

創薬研究用ヒト腎細胞お問い合わせアドレス

Mail: 3D-RPTEC@nikkiso.co.jp

HP: <https://www.nikkiso.co.jp/products/industrial/3drptec/>

