

通常培養の細胞数増減／毒性試験／生存試験

# 『細胞の』 ATP測定試薬 ver.2

## 製品のご紹介

『細胞の』ATP測定試薬Ver.2は、細胞数の少ない培養初期から生細胞数の変化をみることができます。細胞溶解成分やATPaseブロッキング試薬を含んだ1液型の発光試薬で、試薬を添加・混和するだけの1ステップで測定が開始できます。試薬の調製や培地の除去、細胞の洗浄は不要で、試薬の添加により細胞中からATPが抽出され、ATP量に比例した発光を生じます。発色法では困難な浮遊細胞も接着細胞と同様に測定できます。また、検体との混和性に優れているため、384ウェルプレート使用時の混和不足により生じる時間経過に伴う発光量のずり上がり現象もなく安定しています。HTSなどの96/384ウェルプレートを用いた多検体測定に適した仕様です。

## 製品の特長

- **安定性** -20℃での長期保管が可能
- **高感度** 384ウェルプレートでの二次元培養で10個の細胞から検出
- **簡便** 細胞溶解剤を含んだ一液型で操作は1ステップ（試薬添加・混和⇒測定）
- **迅速** 試薬添加後10分から測定が可能
- **高溶解力** 細胞溶解不足による時間経過による発光量上昇は生じない
- **発光安定** 発光が長時間安定（発光半減期 3時間以上）
- **安全性** 毒劇物該当物質を含まない

## 製品仕様

コード No.	メーカーコード	容量	保管条件	構成
381-09301	CA2-10	10mL		発光試薬（凍結品） 10mL 1本
381-09306	CA2-50	50mL	-20℃	発光試薬（凍結品） 50mL 1本
387-09303	CA2-100	50mL×2	遮光	発光試薬（凍結品） 50mL 2本
385-09304	CA2-1000	50mL×20		発光試薬（凍結品） 50mL 20本

## 参考データ

### 室温 (23°C) 静置安定性試験

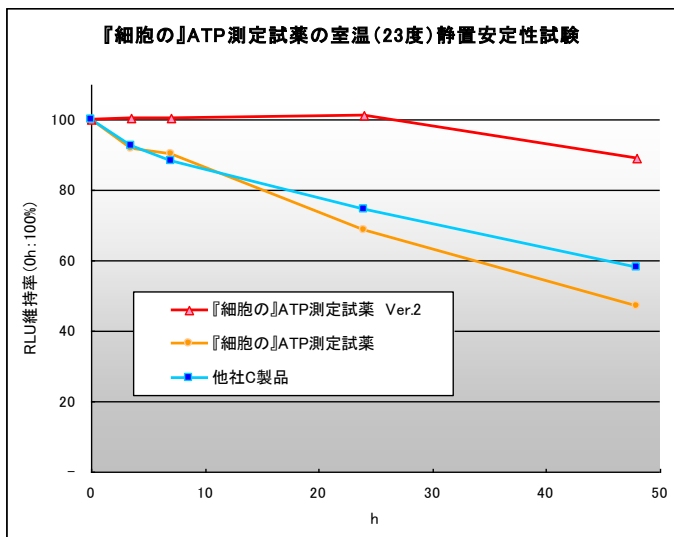


図1. 『細胞の』ATP測定試薬の室温(23°C)配置安定性試験  
室温(23°C)に静置した時の試薬劣化度を測定。Ver.2は室温下でも24時間経過時でも劣化は示さず、昼夜の連続測定にも安心して使用可能。

### 加温 (37°C) 試験

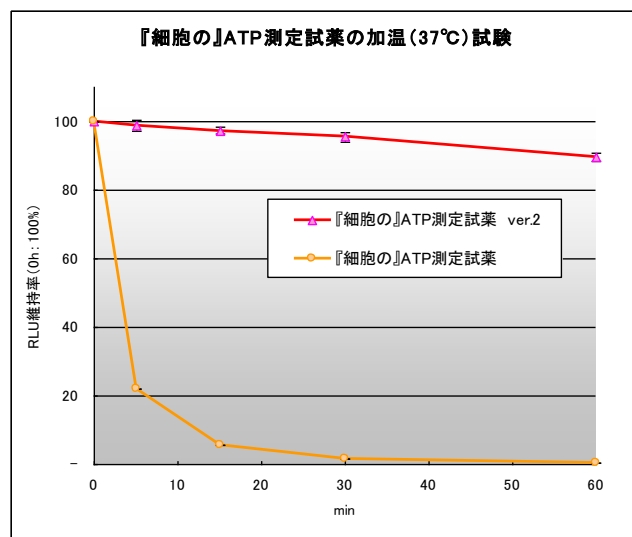


図2. 『細胞の』ATP測定試薬の加温(37°C)試験  
加温(37°C)したときの試薬の性能劣化度を測定。Ver.2は試薬融解時の加温ダメージが小さいことを示す。

### 生細胞数と発光量の相関

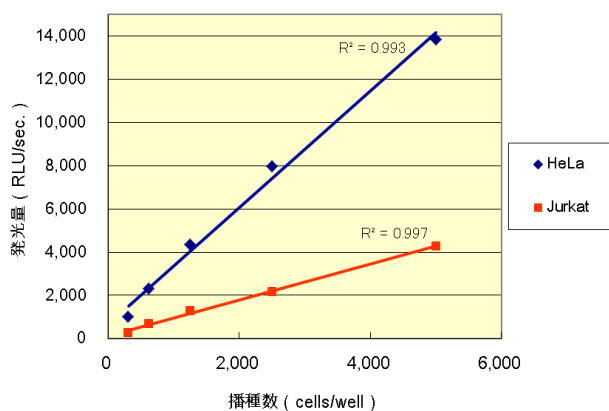


図3. 384wellプレートにおける細胞数測定  
2倍希釈系列に調製した各細胞を分注し(25 $\mu$ L/well)、4時間培養後、等量の『細胞の』ATP測定試薬 Ver.2を加え、ルミノメーターで測定(n=3)。  
※Jurkat (RPMI1640 + 10% FBS)  
※HeLa (MEM + 10% FBS + 1% NEAA)

### 各種細胞株のカイネティクスと発光安定性

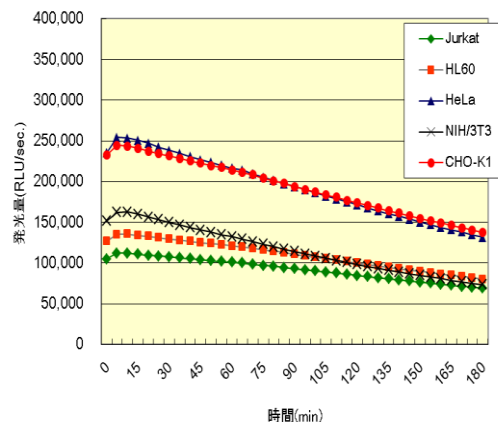
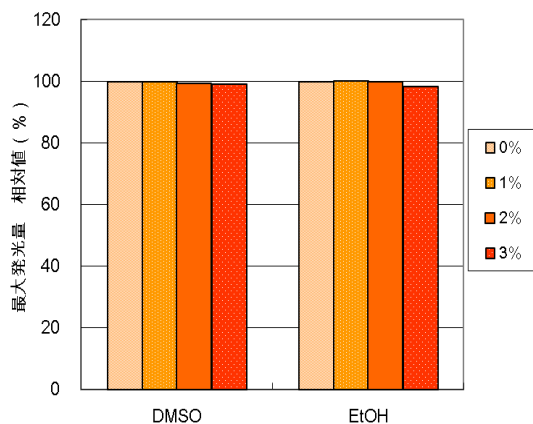


図4. 96wellプレートにおけるカイネティクス  
各細胞※を10,000cells/wellになるように分注し(100 $\mu$ L)、一晚培養後、等量の『細胞の』ATP測定試薬 Ver.2を加え、ルミノメーターで測定(n=3)。各細胞における発光半減期は、3時間以上。  
※Jurkat, HL60 (RPMI1640 + 10% FBS)  
※HeLa, HepG2 (MEM + 10% FBS + 1% NEAA)  
※NIH/3T3 (DMEM + 10% FCS)  
※CHO-K1 (HamF12 + 10% FBS)

### 生細胞数と発光量の相関



### 図5. 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 $\mu$ 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。

## プロトコール

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

### 注意事項

- ※1 本製品をただちに使用したい場合は、37°C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°Cで遮光保存してください。
- ※2 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。
- ※3 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。
- ※4 培地除去、細胞洗浄は不要です。
- ※5 本試薬は光に敏感です。直射日光が当たる所や蛍光灯の直下での作業は控えてください。
- ※6 プレートを23°C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。)
- ※7 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°Cまたは25°C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。

## アプリケーションデータ

### 測定条件

#### 発光試薬

細胞の』ATP測定試薬 Ver.2 10mL

#### 培養培地

MEM + 10%FBS + 1%NEAA

#### 細胞

HeLa 細胞

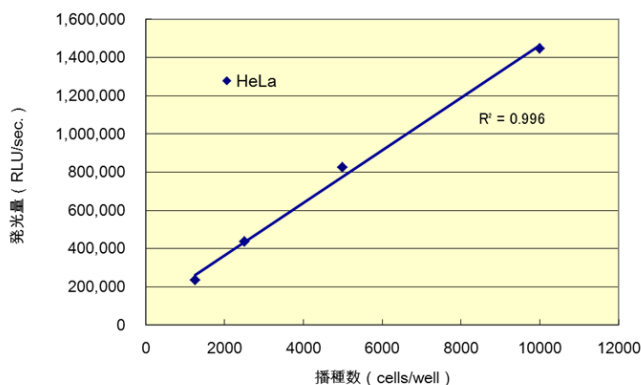
#### 使用機器

Infinite® 200 PRO【Tecan】

### 実験手順

- ① マイクロプレート(白色)に HeLa 細胞を播種し、5% CO<sub>2</sub> 下で 24 時間培養  
播種数：1250、2500、5000、10000 cells/well (100 $\mu$ L/well)
- ② 24 時間培養後、各ウェルに 発光試薬100 $\mu$ L を添加
- ③ マイクロプレートシェーカーを用いて 1 分間攪拌
- ④ 23°Cに設定したプレートリーダー内で10 分間静置
- ⑤ 発光 (RLU) を測定 (RLU/sec)  
発光測定積算時間：1sec/well  
測定温度：23°C

### 測定結果



発光試薬『細胞の』ATP測定試薬 Ver.2 と、マルチタイプのプレートリーダー Infinite 200PRO を用いて細胞のATP量の発光測定を行なうと、細胞数に比例したATP量が確認できた。この結果より、本手法では標準偏差が小さく高精度な検量線が得られ、細胞数とATP量による発光測定値の相関性が高いため、試薬および測定機器の性能と操作性が高いことがわかる。

## 参考文献

1. Okamoto, A., Koike, M., Yasuda, K., Kakizuka, A. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **394**, 42 (2010).
2. Jia, X., *et al.* : *Life Science.*, **90**(23), 934 (2012).
3. Hiyama, G., *et al.* : *Reproduction*, **147**, 167 (2014).
4. Kikuchi, H., Yuan, B., Yuhara, E., Takagi, N., Toyoda, H. : *Int. J. Oncol.*, **43**(6), 2046 (2013).
5. Kikuchi, H., *et al.* : *Int. J. Oncol.*, **45**(2), 1019 (2014).
6. Matsuzaki, M., *et al.* : *Scientific Reports*, **5**, 17643 (2015).
7. Suzuki, T., *et al.* : *Tohoku J. Exp. Med.*, **236**, 225-232 (2015).
8. Matsuzaki, M., Mizushima, S., Ichikawa, Y., Shiba, K., Inaba, K., Sasanami, T. : *J. Poult. Sci.*, **54**, 73 (2017).
9. Sakamoto, A., Saotome, M., Hasan, P., Satoh, T., Ohtani, H., Urushida, T., Katoh, H., Hayashi, H. : *Experimental Cell Research*, **351**(1), 109 (2017).
10. Morimoto, H., Gu, L., Zeng, H., Maeda, K. : *Cosmetics*, **4**(4), 38 (2017).
11. Maeshima, K., *et al.* : *Current Biology*, **28** (3), 444 (2018).

## 製品一覧

コード No.	メーカーコード	品名	保管条件	容量	希望納入 価格 (円)
381-09301	CA2-10			10mL	11,000
381-09306	CA2-50	『細胞の』ATP測定試薬 Ver. 2	-20°C	50mL	21,500
387-09303	CA2-100			50mL×2	41,000
385-09304	CA2-1000			50mL×20	照会

## 関連製品一覧

コード No.	メーカーコード	品名	保管条件	容量	希望納入 価格 (円)
388-09311	KA2-10			10mL	14,500
388-09316	KA2-50	『塊の』ATP測定試薬 Ver. 2	-80°C	50mL	38,000
384-09313	KA2-100			50mL×2	52,500
382-09314	KA2-1000			50mL×20	照会

- 本パンフレットに掲載している製品は、試験・研究の目的にのみご使用されるものであり、「医薬品」、「食品」、「家庭用品」などとしては使用できません。
- 価格には別途消費税がかかります。
- 希望納入価格は2018年6月現在の情報です。予告なく変更する場合がございますので予めご了承ください。

### 製造元

## 東洋ビーネット株式会社

東京都中央区京橋二丁目2番一号 TEL:03-3272-1954  
E-mail : bio@toyo-b-net.co.jp

### 販売元

## 富士フイルム 和光純薬株式会社

本社 〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号 TEL : 06-6203-3741 (代表)  
東京本店 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町二丁目4番1号 TEL : 03-3270-8571 (代表)

- 九州営業所 ●中国営業所
- 東海営業所 ●横浜営業所
- 筑波営業所 ●東北営業所
- 北海道営業所



フリーダイヤル 0120-052-099  
フリーファックス 0120-052-806  
試薬URL : <https://labchem.wako-chem.co.jp>

■ FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation ■ FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH  
1600 Bellwood Road, Richmond, VA 23237, USA Fuggerstraße 12, 41468 Neuss, Germany  
TEL: +1-804-714-1920 FAX: +1-804-271-7791 TEL: +49-2131-311-0 FAX: +49-2131-311-100

Online Catalog: [www.e-reagent.com](http://www.e-reagent.com)