

Intracellular ATP 測定キット Ver.2 (IC2-100)

取扱説明書

I. キットの概要	2
II. 製品構成	2
III. 使用方法	3
IV. 参考データ	6
V. トラブルシューティング	7
VI. 使用上の注意	8

保存温度	-20°C <構成品別の保存温度> ATP 抽出試薬: 4°C以下(-20°C可) その他 : -20°C ※調製後の ATP 発光試薬:-80°C(遮光)
使用期限	外箱に記載

I. キットの概要

Intracellular ATP 測定キット Ver.2 「IC2-100」は、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定量する試薬です。専用の ATP 抽出試薬により、細胞中の ATP を効率よく抽出でき、ATP 量を高感度に測定することが出来ます。また、本キットに含まれる ATP 抽出試薬は、タンパク質の抽出効率も良いため、ATP 抽出したサンプルをそのままタンパク質アッセイに用いることが可能です。

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 (Mg^{2+}) の存在下において ATP と反応した後、酸素 (O_2) と反応して励起状態のオキシ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)。

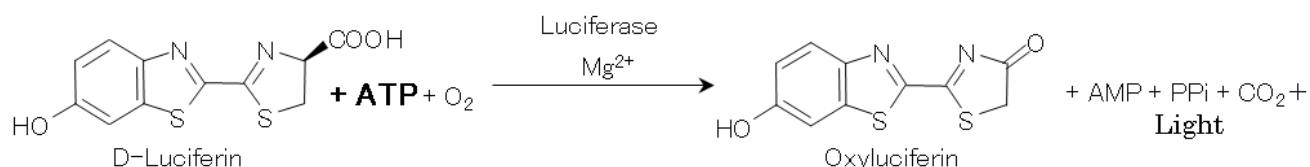


図 1. ホタル・ルシフェラーゼ発光反応機構

II. 製品構成

		製品	
		Intracellular ATP 測定キット Ver.2	Intracellular ATP 測定用 ATP 抽出試薬 4 本セット Ver.2
		100 回用 (IC2-100)	(IC2-106-4)
構成	ATP 発光試薬 Ver.2 (凍結乾燥品)	1 本	—
	ATP 発光試薬溶解液 (12 ml)	1 本	—
	ATP 抽出試薬 (12 ml)	1 本	4 本
	ATP 標準試薬 ($1 \times 10^{-3} M$, 1ml)	1 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	
ATP 発光 試薬の調製	<ol style="list-style-type: none">1. 発光試薬溶解液、ATP 発光試薬 Ver.2(凍結乾燥品)を室温に戻します。 ☞ ATP 発光試薬 Ver.2(凍結乾燥品)は温度による影響を受けます。24°C 以上でのインキュベートや、長時間の室温での放置は避けて下さい。2. ATP 発光試薬 Ver.2(凍結乾燥品)が入ったバイアル瓶のゴム栓をゆっくりと開け、発光試薬溶解液 12ml(全量)を添加して、再度ゴム栓を閉じます。 ☞ バイアル瓶内は陰圧状態です。開封時にパウダーが飛散しないよう、ゆっくりとゴム栓を持ち上げ、切り込み部分から空気を入れてからゴム栓を外して下さい。3. バイアル瓶をゆっくりと数回反転させ、十分に混合します。4. バイアル瓶を室温で 1 時間静置し、試薬を馴染ませます。 ☞ ATP 発光試薬 Ver.2(凍結乾燥品)に発光試薬溶解液を加えて調製した“ATP 発光試薬(調製済)”は、<u>-80°Cにて遮光保存して下さい。</u> <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。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°C 以上でのインキュベートや、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。また、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、<u>必要量ずつ小分けにして -80°C で遮光保存することをお勧めします。</u></p>
ATP 標準 試薬	☞ 一度の測定で使い切らない場合は、必要量ずつ小分けにし、凍結融解をできるだけ避けることをお勧めします。

<測定プロトコル> 動物培養細胞からの ATP の抽出・発光量の測定

①	細胞培養	1. ウェルプレートで細胞を培養します。												
②	ATP 抽出	<p>2. 培地を除去し、PBS でウェルを洗浄します。</p> <p>3. 室温に戻した ATP 抽出試薬を添加します。</p> <p style="text-align: center;"><ATP 抽出試薬の添加量></p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th>プレートの種類</th> <th>添加量 (μl)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>96 well</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>48 well</td> <td>260</td> </tr> <tr> <td>24 well</td> <td>400</td> </tr> <tr> <td>12 well</td> <td>800</td> </tr> <tr> <td>6 well</td> <td>2000</td> </tr> </tbody> </table> <p>4. 室温で 5 分間攪拌し、細胞から ATP を抽出します。</p> <p style="margin-left: 20px;">☞ ATP 抽出操作は、室温で行って下さい。氷中では、ATP の抽出が不十分となることがあります。</p> <p>5. 細胞溶解液をチューブに回収し、氷中に移します。</p> <p style="margin-left: 20px;">☞ 抽出した ATP は 30 分以内が特に安定です。ATP 抽出後は 30 分以内にステップ③の発光測定を終了することを推奨します。</p> <p>◆ATP を抽出した細胞溶解液は、そのままタンパク質測定のための検体として使用することが可能です。</p> <p style="margin-left: 20px;">☞ タンパク質アッセイを行う場合は、界面活性剤に耐性のある試薬を使用して下さい(ex BCA 法)。</p>	プレートの種類	添加量 (μl)	96 well	100	48 well	260	24 well	400	12 well	800	6 well	2000
プレートの種類	添加量 (μl)													
96 well	100													
48 well	260													
24 well	400													
12 well	800													
6 well	2000													
③	発光測定	<p>6. ATP を抽出した 5. の溶液から 10 μl を抜き取り、発光測定用チューブに移します。</p> <p>7. 室温に戻した ATP 発光試薬(調製済)100 μl を添加し、軽く振って攪拌後、ルミノメーターで発光量を測定します。</p> <p style="margin-left: 20px;">☞ ATP 発光試薬(調製済)を添加した後は、素早く測定を開始して下さい。また、ATP 発光試薬(調製済)の添加から測定開始までの時間を統一して下さい。タイムラグの差異は、発光量の減衰による測定誤差の原因となります。</p> <p style="margin-left: 20px;">ex) 発光試薬の添加から 5 秒後に測定を開始する</p>												
④	ATP 量の算出	8. ATP 濃度と発光量から作成した検量線(5 ページ参照)を用いて、検体中の ATP 量を算出します。												
※	タンパク質量の測定	ステップ②で調製した細胞溶解液をタンパク質アッセイに使用する場合は 5. の溶液 80 μl をサンプルとして用いて下さい(推奨)。												

☞測定毎に、同濃度の ATP 溶液を用いて試薬の発光活性を確認することをお勧めします。
(5 ページ参照)

＜測定プロトコル＞		ATP 標準試薬を用いた検量線の作成
①	試薬の準備	1. ATP 標準試薬 ($1 \times 10^{-3} \text{M}$) および ATP 発光試薬 (調整済) を室温に戻します。
②	希釈系列の調製	2. ATP 抽出試薬を用いて、ATP 標準試薬の 10 倍希釈系列 ($10^{-7} \sim 10^{-12} \text{M}$) または 2 倍希釈系列を調製します。 ⇨ 検体中の ATP 濃度を精度高く算出する場合は、10 倍希釈系列の ATP 溶液で作成した検量線によりおおよその ATP 濃度を把握した後、2 倍希釈系列の ATP 溶液を用いて検量線を作成することをお勧めします。 3. 2. で調製した各濃度の ATP 溶液 10 μl を各々チューブに入れます。
③	発光測定	4. 室温に戻した ATP 発光試薬 (調整済) 100 μl を添加し、軽く振って攪拌後、ルミノメーターで発光量を測定します。 5. ATP 濃度と発光量の対数グラフ (または相関グラフ) を作成します。

⇨ 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。

※上記プロトコルにより、ATP 発光試薬 (調整済) の発光活性を確認することが出来ます。
その場合は、ステップ②において、 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ の ATP 溶液のみを調製します。

IV. 参考データ

A. ATP 濃度と発光量の相関

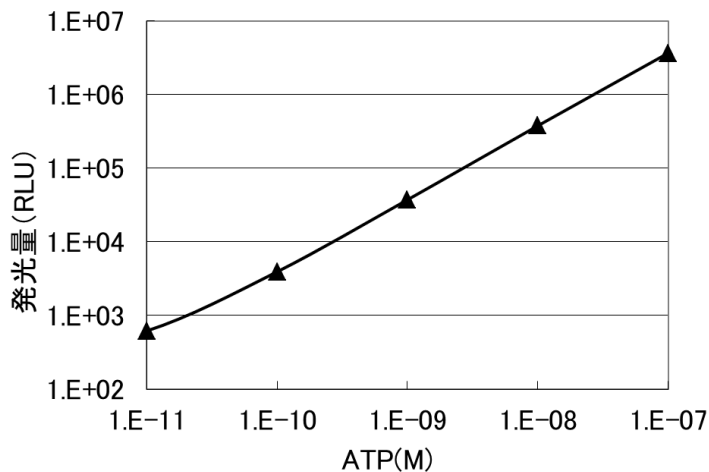


図 2. ATP 検量線

ATP 抽出試薬で ATP 標準試薬 ($1 \times 10^{-3} \text{M}$) の 10 倍希釈系列を調製し、プロトコルに従って発光量を測定 ($n=2$)。

※相関係数は、0.999 以上

B. 細胞播種数と ATP 量(発光量)の関係

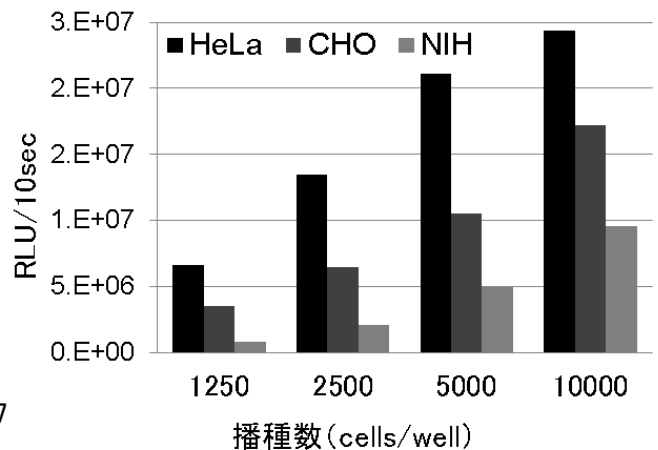


図 3. 細胞中の ATP 量の測定

HeLa、CHO-K1、NIH/3T3 細胞を 96well プレートに播種し、4 時間培養後、プロトコルに従って発光量を測定 ($n=3$)。

C. 細胞溶解液を用いたタンパク質アッセイ

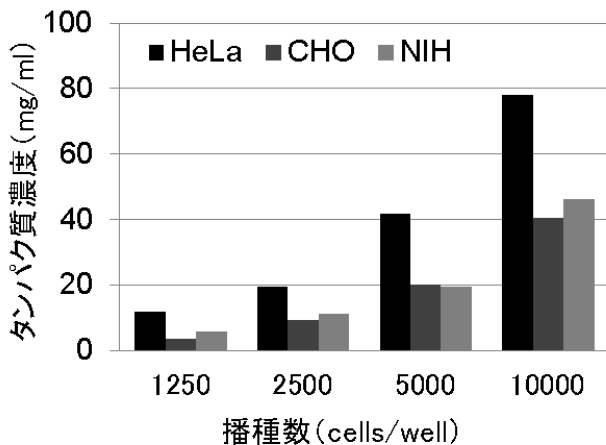


図 4. 細胞溶解液中のタンパク質量の測定

図 3. において ATP 量を測定した細胞溶解液中のタンパク質量を測定 ($n=2$)。

※タンパク質量の測定は BCA 法により実施。

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。	細胞中の ATP 量が少ない。	<ul style="list-style-type: none"> ● 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>＜バックグラウンドシグナルの測定方法＞</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 測定チューブに、ATP 抽出試薬 10 μl を入れる。 2. ATP 発光試薬(調整済)100 μl を添加し、軽く振って攪拌後、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>
	細胞中の ATP が分解、枯渇している。	<ul style="list-style-type: none"> ● 培養直後の細胞を使用して下さい。
	細胞からの ATP の抽出が不十分である。	<ul style="list-style-type: none"> ● ATP 抽出試薬は必ず室温に戻してから使用して下さい。 ● ATP 抽出操作は室温で行って下さい。水中では ATP の抽出が不十分となることがあります。
	抽出した ATP が分解している。	<ul style="list-style-type: none"> ● ATP 抽出後の細胞溶解液は、必ず氷中に移して下さい。 ● ATP 抽出後は、30 分以内に発光測定を終了して下さい。
	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)。 ● ATP 標準試薬を用いて、ATP 発光試薬(調製済)の性能確認を行って下さい(5 ページ参照)。
	ATP 発光試薬(調整済)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。ATP 発光試薬(調製済)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。	<ul style="list-style-type: none"> ● 滅菌済みの器具・容器を使用して下さい。 	
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。	検体中の ATP 量が多い。	<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。 ● 測定時の ATP 濃度を下げるために、ATP 抽出後の細胞溶解液を ATP 抽出試薬で希釈して下さい。または、細胞播種数を減らして下さい。
	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。	発光試薬の添加から測定を開始するまでの時間が異なる。	● ATP 発光試薬(調製済)の添加から測定開始までの時間を各検体で統一して下さい。
	検体中の ATP 量に差がある。	● 培養条件を統一して下さい。
	検体の保存中に ATP が分解している。	● 保存検体で ATP 量を測定する場合は、同一条件で保存した検体を使用して下さい。
	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
E-mail: bio@toyo-b-net.co.jp
HP: <http://www.toyo-b-net.co.jp/>