3D Cell Viability Detection Kit (Luminescence)

说明书

Cat. No.: EZB-CV3

一、产品简介

本试剂盒是一款借助ATP依赖的荧光素酶催化的荧光素发光反应，通过化学发光信号测定细胞内ATP含量，从而定量检测3D培养中的活细胞数目或检测3D细胞活力的试剂盒。本试剂盒的性能与Cell Viability Detection Kit (Luminescence)（货号：EZB-CV1）相似，但其具有更强的裂解能力，专门设计用于3D细胞培养中产生的微组织检测。试剂盒中的3D Cell ATP Detection Reagent为即用型，含有热稳定的荧光素酶（luciferase）和高纯度的荧光素（luciferin），无需洗涤细胞，也无需更换或去除培养液，直接在3D细胞培养物中加入本试剂使细胞裂解，释放出ATP，即可发生如下图1所示的反应。发光强度与ATP的量在一定范围内成正比。本试剂性能优异，具有线性相关性好、特异性高、信号半衰期长等特点。

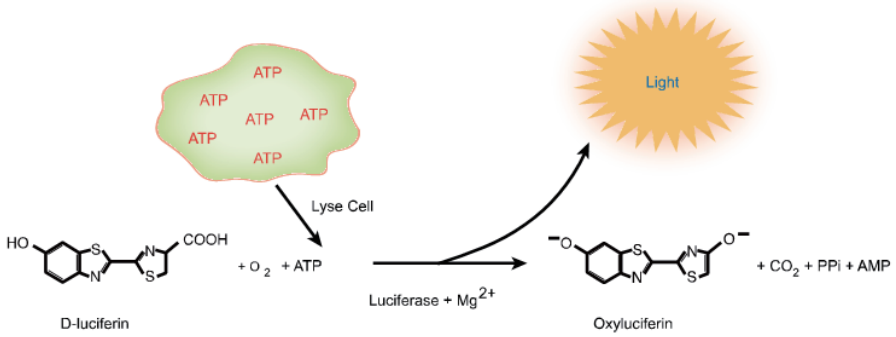

图1. 3D Cell Viability Detection Kit (Luminescence)试剂盒原理概述

二、产品组分

货号（规格） 组分	EZB-CV3-S (100 assays, 100 μl/assay)	EZB-CV3 (1000 assays, 100 μl/assay)	EZB-CV3-L (5000 assays, 100 μl/assay)
3D Cell ATP Detection Reagent	10 ml	100 ml	100 ml × 5

注：对于 10 ml 3D Cell ATP Detection Reagent：足以在 96 孔板中进行 100 次 assays，每次 assay 用 100 μl；或 384 孔板中进行 400 次 assays，每次 assay 用 25 μl。

三、保存条件

本试剂盒-20°C 避光可保存 6 个月，-80°C 避光可保存 12 个月以上。过期日期详见产品标签中的有效期信息。为了获得最大的光信号，我们建议在-80°C 下长期避光保存。3D Cell ATP Detection Reagent 在 4°C 保存 4 d 或在室温（15 ~ 25°C）保存 12 h 后，仍保持 90%以上的活性。第一次解冻后，该试剂可再进行不超过 5 次冻融，且无明显的活性损失。如需对 3D Cell ATP Detection Reagent 分装保存，建议采用高压灭菌后的洁净的离心管、试剂瓶、移液管等进行分装，且分装时应戴上手套，小心操作，以防止发生 ATP 污染。

四、自备材料

具有发光检测模块的酶标仪、适合于发光检测的标准不透明壁多孔板（贴壁处理的无菌板，用于 3D 细胞培养）、多孔板振板装置、单通道或者多通道移液器、水浴锅。

五、操作步骤

1. 试剂准备

如果 3D Cell ATP Detection Reagent 保存在-20°C 冰箱中，则可直接将其放入 22°C 水浴中放置 40 min（期间轻轻晃动 2 ~ 3 次），以解冻试剂并将试剂平衡至 22°C，然后用力上下颠倒 10 次充分混匀。

也可将 3D Cell ATP Detection Reagent 放在 4°C 冰箱中过夜解冻，使用前在 22°C 水浴锅中放置 30 min（期间轻轻晃动 2 ~ 3 次），使试剂平衡至 22°C，然后用力上下颠倒 10 次充分混匀。**注意水浴锅的水温不要超过 25°C**。

注意：在 22°C 的水浴中，一般 100 ml、4°C 解冻的本试剂需要约 30 min，500 ml、4°C 解冻的本试剂需要约 100 min 才能平衡至 22°C。

2. 细胞活力检测的步骤

2.1 从培养箱中取出 3D 细胞培养板，室温（约 22°C）放置约 30 min 使培养板的温度平衡至室温。

2.2 加入与待测 3D 细胞培养液**等体积且平衡至室温**的 3D Cell ATP Detection Reagent（例如，使用 96 孔培养板时，将 100 μl 3D Cell ATP Detection Reagent 添加到 100 μl 的待测 3D 细胞培养液中）。

2.3 室温振荡混匀 5 min 使细胞充分裂解。

2.4 在室温条件下放置 25 min 以稳定发光信号，然后即可进行检测。

2.5 使用多功能酶标仪进行化学发光检测。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 sec，具体需根据仪器的检测灵敏度进行适当的调整。

六、注意事项

1. **温度：**发光信号的强度和衰减速率取决于荧光素酶的反应速率。温度是影响该酶的测定速率并因此影响荧光输出的一个因素。因此为了保持检测结果的一致性，在加样前需要将本试剂与细胞培养物均平衡至室温（约 22°C）。注意批量操作时，从 37°C 恒温箱中取出的并在室温下堆叠放置的多孔板比单层放置的多孔板需要更长的时间平衡至室温，**未充分平衡可能会使多孔板中心和边缘孔间出现温度梯度效应**。
2. **化学物质：**不同培养基的化学成分会有差异，这样会影响萤光素酶反应的酶促速率，进而使发光强度和衰减速率会有不同。药物含量较高时可能会干扰荧光素酶反应，从而影响化学发光信号。建议设置含有溶剂的细胞培养液对照孔以排除溶剂的干扰。
3. **多孔板：**建议使用适合于发光检测的标准不透明壁多孔板，不同类型的多孔板测得的发光强度也会有所不同。具有透明底部的不透明壁板有利于在显微镜下观察细胞，但使用这类孔板会降低信号强度，并增加孔间干扰；使用黑色多孔板可有效降低孔间影响，但光值损耗较大；使用白色多孔板可有效减少光值损耗，但会存在一定的孔间干扰。建议根据实验需要对不同类型的多孔板进行选择。
4. **混匀：**只有当 3D Cell ATP Detection Reagent 与培养的细胞完全混匀后使细胞充分裂解时才能获得最佳的检测结果。混合不充分可能导致对 ATP 数量的低报，并可能产生不准确的结果。384 孔板相较于 96 孔板更不易混匀，混匀时可能需要使用半径小于孔直径的特殊电磁振动设备。建议通过显微观察确定细胞的裂解程度，以优化混匀方案。另外，培养基的深度和多孔板几何形状可能会影响混合效率，建议在进行检测时应考虑这些因素，以确定应用中可能需要怎样的混匀程度。
5. **ATP 污染：**严格的无菌技术对于防止 3D Cell ATP Detection Reagent 的 ATP 污染至关重要。进行实验操作时，须戴上手套并避免接触可能被污染的表面和设备，且尽可能使用不含 ATP 的移液器和移液器吸头。