

产品概述

Bio-Pro™ 3D Luminescent Cell Viability Reagent是一种基于荧光素酶系统的细胞活力检测试剂。本试剂中含有高纯度的荧光素(Luciferin)、热稳定的荧光素酶(Luciferase)，和经过优化的反应试剂，使得裂解能力更强，更适用于3D细胞培养条件下的微组织细胞团样本。在细胞培养物中加入本品使细胞团裂解，释放出ATP，即可产生如图1所示的反应，发出稳定的光信号。发光强度与ATP的量，即活细胞数量在一定范围内成正比，因此本品可对活细胞数目进行定量检测。

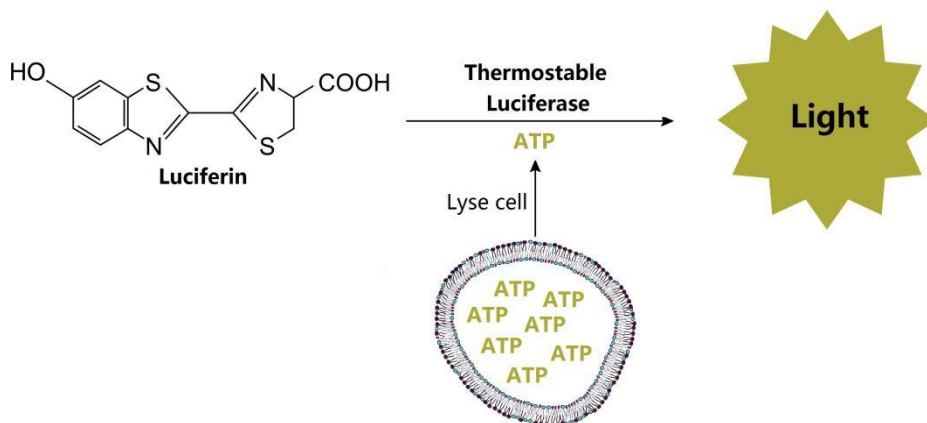


图1.Bio-Pro™ 3D Luminescent Cell Viability Reagent检测原理示意

如图2所示，本品为即用型溶液，将等体积的试剂直接加入到细胞培养物中，振荡混匀5 min至细胞团完全裂解，孵育25 min后即可进行检测。本试剂盒产生的“辉光型”信号非常稳定，半衰期通常可达3 h，因此非常适合于高通量的细胞增殖及细胞毒性检测。此外，本品含有特殊的稳定成分，可在室温稳定放置7天，2 ~ 8℃稳定放置60天，避免了分装或反复冻融，提高了操作的便捷性。

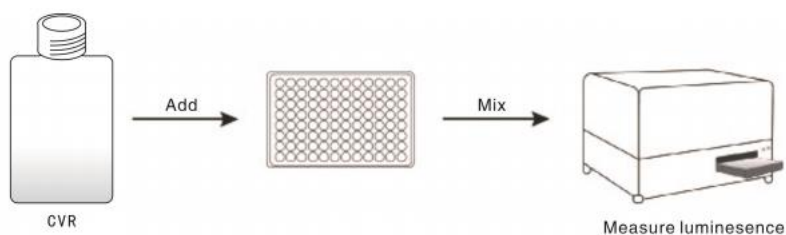


图2. Bio-Pro™ 3D Luminescent Cell Viability Reagent操作流程示意

产品组分

货 号	KC1602-1D	KC1602-1B
CellCounting-Lite™ 3D Luminescent Cell Viability Assay	10 ml	100 ml

保存条件

长期保存：-30 ~ -15℃；运输条件：≤0℃。

融化后的Bio-Pro™ 3D Luminescent Cell Viability Reagent 可在室温保存7天或在2 ~ 8℃保存60天(>85%活性)。本品反复冻融10个循环仍可保持稳定，未使用完的试剂若长期不用建议置于-20℃保存。

实验准备

自备材料

单/多通道移液器；适用于3D细胞培养的白色/黑色多孔板；多孔板振板装置；具有发光检测模块的酶标仪。

操作流程

试剂准备

1. 融化：将本品置于2~8℃或室温条件下融化。也可将本品放置于22℃水浴融化，但需要注意水温不可超过25℃。
2. 平衡至室温：若本品于非室温条件下融化，使用前可将其放置于22℃水浴一段时间以平衡至室温。一般针对10 ml包装需要约10 min；100 ml包装需要约30 min；400 ml包装需要约100 min。
3. 使用前轻柔颠倒5次使溶液混合均匀。

检测步骤

1. 于培养箱中取出待测细胞培养板，室温放置30 min，以使培养板温度平衡至室温。
2. 加入与待测细胞培养物等体积并平衡至室温的Bio-Pro™ 3D Luminescent Cell Viability Reagent。例如，使用96孔培养板时，吸取100 µl Bio-Pro™ 3D Luminescent Cell Viability Reagent加入100 µl待测细胞培养物中。
3. 剧烈振荡5 min使细胞团充分裂解；室温放置25 min以稳定发光信号，即可进行检测。

注意事项

1. 温度：发光的强度以及衰减速度取决于荧光素酶的反应速率。温度对酶反应速率有直接影响，因此在加样前，需要将本品与细胞培养物均平衡至室温，以确保检测结果的一致性。特别注意在批量操作时，堆叠放置的多孔板比单层放置的多孔板需要更多的时间平衡至室温，未充分平衡可能会引起多孔板温度不均，致使多孔板中心和边缘孔间的梯度效应。
2. 化学因素：不同培养基的化学成分会有差异，因此使用不同类型的培养基和血清，发光的强度和衰减速率会略有不同。另外，化合物对细胞团进行处理时所引入的溶剂也可能对发光有影响。可以通过设置含有溶剂的培养基对照孔排除溶剂干扰。经测试常用溶剂如DMSO、甲醇、乙醇的终浓度<2%时，对发光信号无显著影响。
3. 细胞内ATP含量：不同种类细胞的ATP含量不同。此外，微组织细胞团自外部的活细胞层到中心的非活细胞层ATP浓度逐渐递减，这种相对变化因细胞种类的不同也会出现差异。在3D细胞培养条件下，很容易出现单个孔样本过量(即ATP浓度超过检测上限10 µM)的情况。若出现此类情况，我们建议尽可能使用较小的微组织细胞团，或将样本稀释后再进行检测。特别注意在稀释后需立即检测，以免操作时间过长导致ATP降解。
4. 细胞培养物体积：确保待测细胞培养物与测试化合物的总体积小于孔容量的一半，在与本品等体积混合振荡后，不会引起孔间的交叉污染。
5. 混匀：只有当本品完全与待测细胞团混合接触，将细胞充分裂解时才能充分反应，获得最佳的检测性能。若细胞团未充分裂解，致使复孔间发光值不均，可通过适当增加振板幅度或延长孵育条件进行优化。此外，由于多孔板的孔径和液体深度均会影响混合效率，384孔板相较于96孔板更不易混合均匀。我们建议选择具有水平振荡模式的振板仪器，具体振板参数和孵育时间可根据实际的细胞类型和3D细胞培养条件进行调整。
6. 微生物污染：环境中的微生物污染会引入外源ATP，从而引起本底信号升高。我们建议操作时佩戴口罩和乳胶手套，并注意实验台面整洁，谨慎开盖。