

ATP 測定試薬を用いた細胞数と発光量の相関

はじめに

細胞内の ATP 量は、細胞生存性と相関関係があり、生細胞数の指標となります。ルシフェラーゼ発光で ATP 量を測定する方法は、同じく呼吸系代謝を利用した生細胞検出発色方法と比べ、非常に高感度な測定法であるため、培養初期の細胞数が少ない日数から細胞数の変化を測定することが可能です。

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反応を通して光を生じます。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+})存在下において、ATP と反応した後、酸素分子(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します。ルシフェラーゼ発光反応は、ATP が必須因子であるため、生じる発光量は ATP 量に比例します。

(図 1)

『細胞の』ATP 測定試薬 Ver.2 は、培養細胞中のアデノシン三リン酸(ATP)量をホタル・ルシフェラーゼ発光法で測定する少数検体から多検体測定まで広い使用環境に適した動物細胞用の細胞増殖・毒性試験用試薬です。ルシフェリンと、ルシフェラーゼの反応を制御する試薬構成を独自に開発したことにより、接着細胞と浮遊細胞ともに発光の安定性が高く、試験化合物を溶解させるための溶媒の影響も考慮した仕様となっています。また、細胞溶解剤とルシフェラーゼ発光試薬が 1 液となっており、培養プレートに直接、発光試薬を添加でき、試薬添加後すぐに細胞溶解が開始されるため、試薬添加 10 分後から測定ができる簡便性と迅速性に優れています。さらに、試薬組成を工夫することにより、製品の耐熱性が大幅に向上したため、アッセイ時間が長時間にわたるハイスループット・スクリーニングにおいても、試薬の性能が低下することはありません。

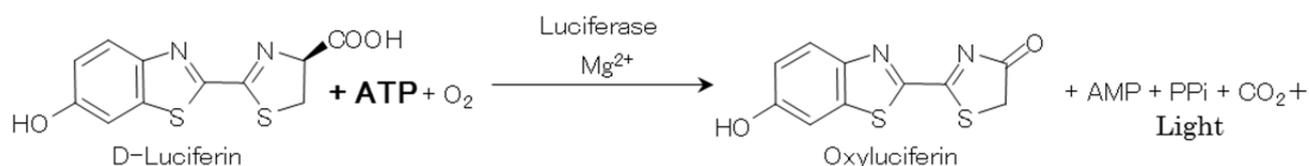


図1. ホタル・ルシフェラーゼ発光反応機構

測定機器・器具

マルチプレートリーダー： 005-00430 Infinite® 200 PRO 【Tecan】

マイクロプレート： 640-03341 (3610) 96 ウェル White Plate Clear Bottom 【Corning】



試薬・細胞

発光試薬： 381-09301 (CA2-10) 『細胞の』ATP測定試薬 Ver.2 10mL 【東洋ビーネット】

培養培地： MEM + 10%FBS + 1%NEAA

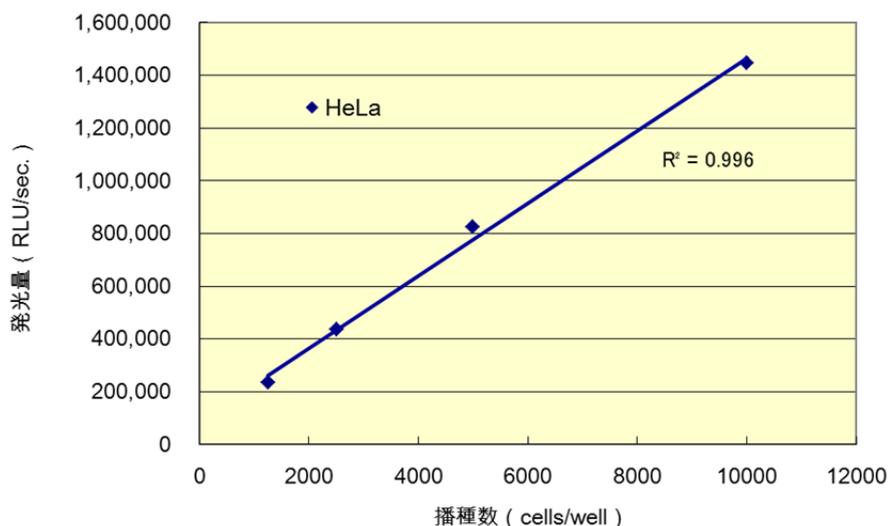
細胞： HeLa 細胞

実験手順

- ① マイクロプレート（白色）に HeLa 細胞を播種し、5% CO₂ 下で 24 時間培養
播種数： 1250、2500、5000、10000 cells/well (100μL/well)
- ② 24 時間培養後、各ウェルに 発光試薬 100μL 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℃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℃

結果と考察

播種数 (cell/well)	実測値①	実測値②	実測値③	平均値(n=3)
1250	234200	234001	233881	234027
2500	434046	434429	434235	434237
5000	824744	824866	824504	824705
10000	1445518	1445992	1445203	1445571



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。

以上

<製品紹介 URL>

『細胞の』ATP測定試薬 Ver.2 : www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/benet_CellATP_ver2/index.htm

マルチプレートリーダー : www.wako-chem.co.jp/siyaku/kiki/multi/infinite_200pro/index.htm