

Cell Counting Kit-Luminescence

细胞增殖/毒性检测试剂盒-发光法(CCK-L)

概述

ATP 是生物体内最直接的能量来源，在肌肉收缩、代谢反应、主动运输等方面被广泛使用，甚至被称作生物体内的能量货币。同仁化学研究所开发的 Cell Counting Kit-Luminescence 试剂盒是一种通过 Luciferase 来确定细胞中的腺苷三磷酸 (ATP) 的细胞增殖-毒性检测试剂盒。

本试剂盒只需将各试剂混合后加入孔板，10 分钟后即可检测。不需要去除培养基、清洗细胞等复杂的操作。此外，本试剂盒还有诸如发光的半衰期在 3 小时以上、数据的重现性高、兼容 96 孔板、384 孔板的多样品检测等诸多优点。

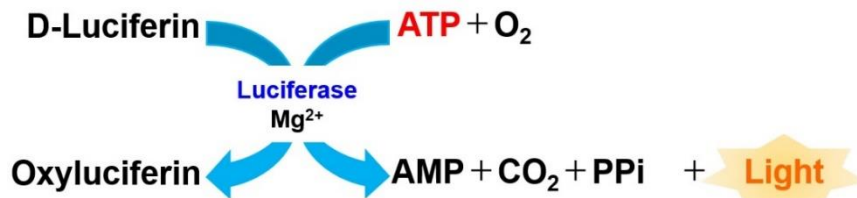


图 1. Cell Counting Kit-Luminescence 检测原理

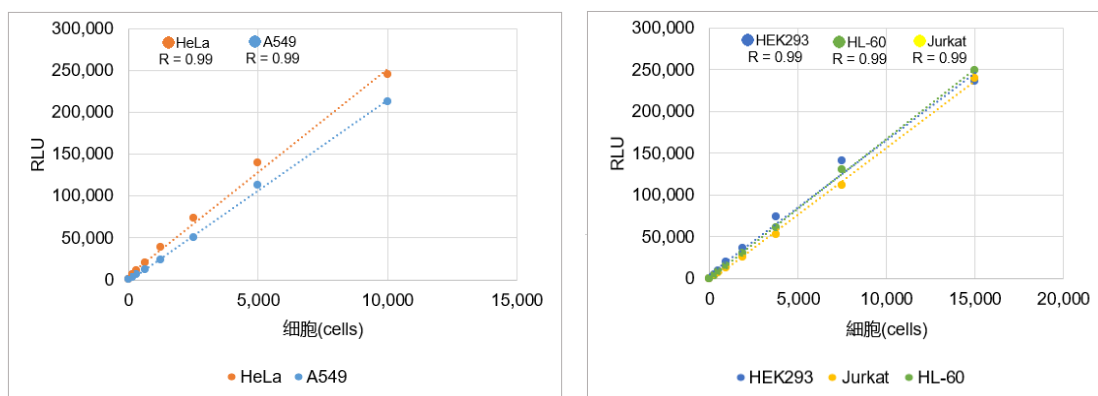


图 2. 白色 96 孔板各种细胞的检测示例

各细胞进行 2 倍梯度稀释制成细胞悬液。白色 96 孔板中，每孔加入 100 μ l 细胞悬液，过夜培养后加入相同体积的 Working solution，震荡后静置 10 min，检测发光值。

* HeLa:含 10% FBS 的 MEM 培养基； A549:含 10% FBS 的 DMEM 培养基； Jurkat:含 10% FBS 的 RPMI 培养基； HEK293:含 10% FBS 的 DMEM 培养基； HL-60:含 10% FBS 的 RPMI 培养基。

产品信息

	100 tests \times 2
Enzyme Solution	20 μ l \times 2
Substrate	\times 2
Assay Buffer	11 ml \times 2

保存条件

0~5°C保存

所需设备和材料

- 酶标仪
- 白色 96 孔板/白色 384 孔板
- 20-200 μ l 多通道移液器
- 100-1000 μ l、20-200 μ l、2-20 μ l 单通道移液器

注意事项

- 使用前先将试剂盒的温度恢复至常温。
- 由于运输过程中的震动等原因，试剂盒中的试剂可能会附在管壁或瓶盖内侧，请先将试剂敲落至管底再使用。
- 试剂盒内含有铝盖玻璃瓶。使用时建议佩戴手套，小心操作。
- 为获得准确的结果，建议设置复孔 (n=3 或以上)。
- 为减少实验误差，建议设置复孔 (n=3)。
- 请预先确认细胞数的线性范围，然后再进行检测。

溶液配制

Working solution 的配制

1. 向 Substrate 瓶中加入 1 ml Assay Buffer。
*请注意瓶内为真空状态，剥除铝制封口和打开橡胶瓶盖时请小心操作，避免试剂飞溅。
2. 重新盖好 Substrate 瓶的橡胶瓶盖，充分颠倒混匀后全部倒入 Assay Buffer 瓶中。
3. 向 Assay Buffer 瓶中加入 20 μ l Enzyme solution，充分颠倒混匀，制成 Working solution。
*Enzyme Solution 管中的试剂有可能会附着于瓶盖内侧和管壁，使用前请将试剂全部敲落至管底。
*配制好的 Working solution 请冷冻(-20 $^{\circ}$ C)保存。(可稳定保存 10 日)

操作步骤

1. 白色 96 孔板中，每孔加入 100 μ l 细胞悬液（白色 384 孔板，每孔加入 25 μ l 细胞悬液）。
*为了获得更准确的检测结果，建议每个实验组至少设置三个复孔 (n=3)。
2. 各孔中加入 100 μ l Working solution（白色 384 孔板，每孔加入 25 μ l Working solution）。
*气泡会对实验结果产生影响，如果孔中有气泡请尽量清除。
使用电动移液器时，建议使用反向吸液模式(RevPIP Mode)。
*加入 Working solution 后，建议用酶标仪的振荡混匀功能震荡 2 min。由于光照会影响检测结果，如果必须在有光源的地方震荡，建议用铝箔纸包覆孔板。
3. 将孔板静置于温度设定在 25 $^{\circ}$ C 的酶标仪内 10 min。
*如果酶标仪没有温度设定的功能，请将孔板至于 25 $^{\circ}$ C 培养箱或 25 $^{\circ}$ C 左右室温下，避光培养 10 min。
*为了保证发光信号的稳定性，建议此处的培养时间不要低于 10 min。
4. 检测发光值 (RLU)。

实验例

Mitomycin C 的细胞毒性评价

1. 白色 96 孔中接种 HeLa 细胞 (5,000 cells/ well, 含 10% FBS 的 MEM 培养基)，37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱过夜培养。
2. 去除培养基，各孔加入 100 μ l 用培养基稀释的各浓度 (0~100 μ mol/l) Mitomycin C 溶液，37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱过夜培养。
3. 各孔加入 100 μ l Working solution。
4. 使用酶标仪的振荡功能，震荡 2 min。
5. 静置于温度设定在 25 $^{\circ}$ C 的酶标仪内 10 min。
6. 检测发光值 (RLU)。

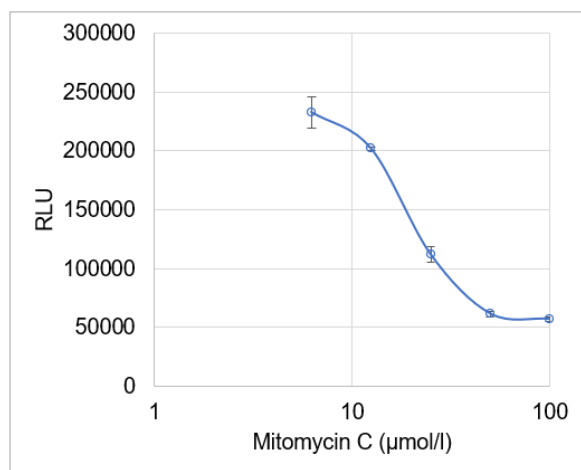


图 3. Mitomycin C 的细胞毒性评价
随着 Mitomycin C 的浓度升高，发光量减小

本产品仅供实验室研究使用，不可用于临床诊断。如果您需要更多信息请通过下面的联系方式联系我们：

网址：www.dojindo.cn

东仁化学科技(上海)有限公司

上海市零陵路 899 号飞洲国际广场 27 楼 J 座

邮编：200030

电话：400-823-9388

E-mail：info@dojindo.cn

北仁化学科技(北京)有限公司

北京市朝阳区裕民路 12 号元辰鑫大厦 E1-210 室

邮编：100029

电话：010-8225-1765