

Alamar Blue 阿尔玛蓝细胞增殖及毒性检测试剂

产品简介

阿尔玛蓝 (Alamar Blue) 是一种细胞活力检测试剂, 包含一种具细胞膜渗透性、无毒性且弱蓝色荧光的指示剂, 即刃天青 (resazurin)。自从 1993 年开始刃天青就作为一种值得信赖和可靠的试剂被引用。阿尔玛蓝是 MTT (噻唑兰) 的有效且无毒替代物。阿尔玛蓝能定量检测人、哺乳动物、细菌、真菌和支原体细胞的增殖情况, 也能用于细胞因子生物活性、细胞活力分析、体外细胞毒性确定以及细胞生长监测。阿尔玛蓝的工作原理在于: 刃天青是一种氧化还原 (REDOX) 指示剂, 根据细胞代谢还原情况发生颜色变化。氧化态的刃天青呈紫蓝色且基本无荧光, 其还原态产物试卤灵 (resorufin) 转变为粉红色且高度荧光, 产生的荧光强度与呼吸活细胞数量成正比。通过检测呼吸过程中氧化水平, 阿尔玛蓝用作一种定量检测细胞活力和毒性的直接指示剂。阿尔玛蓝的颜色变化可通过普通分光光度计检测吸光度变化, 检测波长为 570nm, 参考波长为 600nm; 阿尔玛蓝的荧光变化可通过荧光光度计检测, 激发波长在 530~560nm 之间, 发射波长为 590nm。与台盼蓝、TTC、MTT、MTS 等分析法相比, 阿尔玛蓝为单一试剂, 可连续快速的检测细胞的增殖情况。阿尔玛蓝对细胞无毒无害, 不会干扰电子传递链, 不会干扰细胞呼吸或功能, 也不会影响细胞的抗体合成与分泌等活性, 因此适用于对同一批细胞的增殖情况进行连续观察和更进一步的观察, 具有操作简便和几乎不干扰正常代谢的特征。

产品组成

名称 编号	FS1155	FS1155	FS1155	Storage
Alamar Blue 阿尔玛蓝细胞 增殖及毒性检测试剂	5ml	10ml	50ml	+4℃避 光保存
使用说明书	1 份			

储存条件 +4℃避光保存, 1 年有效。

使用方法

一、标准曲线制作 (最佳孵育时间和细胞密度的测定)

- 收集对数生长期的细胞并进行细胞计数。每孔接种 100ul 细胞悬液, 按比例依次用培养基等比稀释成浓度梯度, 一般做 3-5 个浓度梯度, 每个浓度做 3-6 个复孔。注意要设置阴性对照 (细胞培养基中不加入细胞) 和阳性对照 (只加 100ul 100%还原态 Alamar Blue, 不含细胞)。
- 每孔加入 10ul Alamar Blue, 阳性对照孔加入 10ul 无菌超纯水。
- 将平板放回细胞培养箱孵育。接下来的 6~8h 内每隔 1h 取出平板并测定荧光/吸光值。建议平板孵育过夜并测定第 24h 的荧光/吸光值, 得到以下两组数据:
 - 在任何选定的孵育时间内, 与细胞数量相关的细胞密度对 Alamar Blue 还原水平通过线性反应来确定;
 - 在任何选定的细胞密度上, 测定随着对照细胞所需时间将 Alamar Blue 从氧化态 (蓝色) 转化为完全还原态 (红色) 来确定所需的孵育时间;
- 推荐用荧光分光光度计检测, 激发光波长在 530-560 nm 之间, 发射光波长为 590 nm。或者用普通分光光度计在 570nm 测定吸光值, 参考波长 600nm。也可用 570/630nm 和 540/600nm 替代。

5. 计算在每个特定细胞密度或孵育时间上 Alamar Blue 的还原率。

a) 公式 1: 通过吸光值来计算还原率

$$\text{Alamar Blue 还原率 (\%)} = \frac{(E600 \times A570) - (E570 \times A600)}{[(E570' \times C600) - (E600' \times C570)]} \times 100$$

E600=氧化态 Alamar Blue 在 600nm 波长的消光系数;

E570=氧化型 Alamar Blue 在 570nm 波长的消光系数;

A600=检测孔在 600nm 波长的吸光值;

A570=检测孔在 570nm 波长的吸光值;

E570' =还原态 Alamar Blue 在 570nm 波长的消光系数;

E600' =还原态 Alamar Blue 在 600nm 波长的消光系数;

C570=阴性对照孔在 570nm 波长的吸光值 (不加细胞的培养基+Alamar Blue) ;

C600=阴性对照孔在 600nm 波长的吸光值 (不加细胞的培养基+Alamar Blue) ;

表 1. 阿尔玛蓝 (Alamar Blue) 在不同波长下的消光系数

波长 (nm)	还原态 Alamar Blue	氧化态 Alamar Blue
540	104395	47619
570	155677	80586
600	14652	117216
630	5494	34798

b) 公式 2: 通过荧光值来计算还原率

$$\text{Alamar Blue 还原率 (\%)} = \frac{\text{实验组 FI 590} - \text{阴性对照组 FI 590}}{(100\% \text{还原态 Alamar Blue 阳性对照 FI 590} - \text{阴性对照组 FI 590})} \times 100$$

FI 590=590nm 发射波长 (560nm 激发波长) 下的荧光强度;

6. 绘制在每个特定细胞密度或孵育时间 Alamar Blue 的还原率:

a) 对确定最佳细胞密度的实验, 以细胞密度的对数 (log) 为 x 坐标, Alamar Blue 还原率为纵坐标;

b) 对确定最佳孵育时间的实验, 以孵育时间为 x 坐标, Alamar Blue 还原率为纵坐标;

c) 根据以上曲线图来确定最佳细胞密度或孵育时间。

二、细胞毒性和细胞增殖检测

1. 收集对数生长期的细胞并进行细胞计数。调整细胞数为 1×10^4 个/ml (建议细胞密度), 每孔接种 100 μ l 细胞悬液。最佳细胞密度需根据细胞类型决定。

2. 细胞铺板, 并加入待检测药物。为了确定药物对细胞生长影响, 需设置合适的对照组, 包括刺激和无刺激细胞组。

3. 振荡混匀, 放入细胞培养箱内孵育一段时间。

4. 无菌条件下每孔加入 10 μ l Alamar Blue。阳性对照孔中加入 10 μ l 无菌的超纯水。

5. 放入细胞培养箱内孵育 4-8h, 最佳孵育时间取决于细胞类型。

6. 使用光度计测定细胞毒性或增殖情况。

7. 推荐用荧光分光光度计检测, 激发光波长在 530-560 nm 之间, 发射光波长为 590 nm。或者用普通分光光度计在 570nm 测定吸光值, 参考波长 600nm。使用培养基为空白对照。

8. 计算细胞毒性和增殖实验下对照细胞和处理细胞间 Alamar Blue 还原度的变化百分比。

a) 公式 3: 通过吸光值来计算还原度的变化百分比:

$$\text{Alamar Blue 还原度变化百分比 (\%)} = \frac{(E600 \times A570) - (E570 \times A600)}{[(E600 \times P570) - (E570 \times P600)]} \times 100$$

E600=氧化态 Alamar Blue 在 600nm 波长的消光系数;
E570=氧化态 Alamar Blue 在 570nm 波长的消光系数;
A600=检测孔在 600nm 波长的吸光值;
A570=检测孔在 570nm 波长的吸光值;
P570=阳性对照孔在 570nm 波长的吸光值 (不含待测药物的细胞+ Alamar Blue)
P600=阳性对照孔在 600nm 波长的吸光值 (不含待测药物的细胞+ Alamar Blue)

结果判断: 假如 Alamar Blue 还原度变化百分比 (%) = 62%, 说明相对于对照孔, 检测孔 Alamar Blue 的还原变化值为 62%, 换句话说而言, 相对于对照孔, 38%的检测孔细胞生长受到抑制。

表 1. 阿尔玛蓝 (Alamar Blue) 在不同波长下的消光系数

波长 (nm)	还原态 Alamar Blue	氧化态 Alamar Blue
540	104395	47619
570	155677	80586
600	14652	117216
630	5494	34798

b) 公式 4: 通过荧光值来计算还原度的变化百分比

Alamar Blue 还原度变化百分比 (%) = (实验组 FI 590/阴性对照组 FI 590) × 100

FI 590=590nm 发射波长 (560nm 激发波长) 下的荧光强度;

结果判断: 假如 Alamar Blue 还原度变化百分比 (%) = 25%, 说明相对于对照孔, 检测孔 Alamar Blue 的还原变化值为 25%, 换句话说而言, 相对于对照孔, 75%的检测孔细胞生长受到抑制。

注意事项

- 1) 还原态的 Alamar Blue 在水或水溶性缓冲液如 PBS 中很不稳定, 但在培养基内非常稳定。为了确定特定实验还原态 Alamar Blue 的吸光度/荧光值, 需准备 100%还原态 Alamar Blue 试剂: 将 Alamar Blue 与细胞培养基按照 1:10 的比例混合, 高压灭菌 15min 即可。
- 2) 适宜的细胞密度能够增加检测灵敏度。对于 96 孔板, 建议每孔接种 100 μl 细胞, 细胞浓度范围: 贴壁细胞为 100-10,000 个/孔, 悬浮细胞在 2,000-50,000 个/孔, 以培养基为空白对照。对于 384 孔板, 细胞浓度和接种量均减半。
- 3) 影响细胞对 Alamar Blue 反应的两大变量为孵育时间和铺板密度, 建议实验前需先摸索优化这两个因素。细胞密度过高或孵育时间过长都会导致继发性还原反应, 红色产物停止增加并开始衰减, 导致吸光度/荧光水平明显下跌并伴随红色消失。
- 4) 微生物污染会还原 Alamar Blue。因此对被污染细胞使用 Alamar Blue 检测会引起错误结果。
- 5) Alamar Blue 可以用分光光度计或荧光计检测, 但荧光灵敏度高, 实验误差小, 推荐荧光检测。为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。