

Alamar Blue

Cat# CP0006

产品概述

阿尔玛蓝（Alamar Blue）试剂是一种高效无毒的细胞增殖活性检测试剂，能定量检测人、哺乳动物、细菌、真菌及支原体的代谢情况，也可用于细胞因子生物测定和体外细胞毒性研究。

刃天青（Reazurin）是阿尔玛蓝细胞活力试剂的活性成分，是一种无毒、细胞渗透性化合物，呈蓝色且基本无荧光。活细胞在细胞质内保持还原环境。Reazurin 进入活细胞后，细胞内还原物质将 Reazurin 还原为红色的高荧光化合物试卤灵（Resorufin），产生的荧光强度与呼吸活细胞数量呈正比。活细胞不断地将 Reazurin 转化为 Resorufin，增加细胞周围培养基的整体荧光和颜色，使培养基从无荧光的靛青蓝色变成有荧光的粉红色。因此可以使用普通分光光度计或荧光光度计进行检测，吸光度和荧光强度与活性细胞数成正比。

阿尔玛蓝细胞活力试剂采用单一试剂，已经过优化，可连续快速地检测细胞的增殖情况。该试剂易于使用，具有广泛适用性，无细胞毒性，不影响细胞代谢、细胞因子分泌、抗体合成等，检测后的细胞仍然可以进行后续实验。

产品/组分信息

产品名称	货号	规格
Alamar Blue	CP0006-100T	100 T
Alamar Blue	CP0006-500T	500 T

储存方式

2-8℃避光保存。

使用说明

注意事项

- 为得到最好的结果，建议实验前先摸索孵育时间和接种细胞数量。细胞浓度过高或孵育时间过长，会导致继发性还原反应，红色产物停止增加并开始衰减，导致吸光值/荧光水平明显下跌并伴随红色消失。
- 合适的密度细胞可以增加检测灵敏度。对于 96 孔板，我们建议每孔接种 100 μ L 细胞，细胞浓度范围：贴壁细胞在 100-10,000 个/孔，悬浮细胞在 2,000-50,000 个/孔，并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。
- 整个实验过程应为无菌操作，微生物污染物同样可以还原检测试剂而影响实验结果。
- 孵育时，须注意避光操作。
- 本产品可以使用荧光或分光光度计检测，但荧光的灵敏度高，实验误差小，推荐使用荧光检测。
- 为了您的安全与健康，请穿实验服并戴一次性手套进行实验操作。

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 100 μ L 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】：设置阴性对照（细胞培养基中不加入细胞）和阳性对照（只加 100 μ L 100%还原态 Alamar Blue，不含细胞）。为得到 100%还原型 Alamar Blue，需配制 Alamar Blue 与细胞培养基的混合溶液，Alamar Blue 与细胞培养基的比值为 1:10，高压灭菌 15 min。（不能对浓缩的 Alamar Blue 高压灭菌，也不能用 PBS 配制溶液，因为 100%还原型 Alamar Blue 在 PBS 中不稳定。）

2. 每孔加入 10 μ L Alamar Blue，阳性对照孔加入 10 μ L 无菌超纯水。
3. 将培养板放回细胞培养箱孵育。接下来的 6-8 h 内每隔 1 h 取出平板并测定荧光/吸光值。建议平板孵育过夜并测定第 24 h 的荧光/吸光值，得到以下两组数据：
 - a、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；
 - b、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
4. 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 570 nm 测定吸光值，参考波长 600 nm，也可用 570/630 nm 和 540/600 nm 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

5.1 公式 1：通过吸光值来计算还原率：

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

E570=氧化型 Alamar Blue 在 570 nm 波长的消光系数=80586；

E600=氧化型 Alamar Blue 在 600 nm 波长的消光系数=117216；

A570=检测孔在 570 nm 波长的吸光值；

A600=检测孔在 600 nm 波长的吸光值；

E570'=还原型 Alamar Blue 在 570 nm 波长的消光系数=155677；

E600'=还原型 Alamar Blue 在 600 nm 波长的消光系数=14652；

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

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

如果使用 570/630 nm 和 540/600 nm 作为替代，则：

E540=氧化型 Alamar Blue 在 540 nm 波长的消光系数=47619；

E630=氧化型 Alamar Blue 在 630 nm 波长的消光系数=34798；

E540'=还原型 Alamar Blue 在 540 nm 波长的消光系数=104395；

E630'=还原型 Alamar Blue 在 630 nm 波长的消光系数=5494；

5.2 公式 2：通过荧光值来计算还原率：

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

FI 590=590 nm 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下 Alamar Blue 还原率的标准曲线
 - 6.1 对确定最佳细胞密度的实验，以细胞密度的对数（log）为横坐标，Alamar Blue 还原率为纵坐标
 - 6.2 对确定最佳孵育时间的实验，以孵育时间为横坐标，Alamar Blue 还原率为纵坐标
 - 6.3 根据以上曲线图来确定最佳细胞密度或孵育时间

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。建议调整细胞密度为 1×10^4 个/mL，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。为确定药物对细胞生长的影响，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 无菌超纯水。
5. 放入细胞培养箱内孵育 4-8 h，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 570 nm 测定吸光值，参考波长 600 nm。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。

8.1 公式 3：通过吸光值来计算还原度的变化百分比：

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

E570=氧化型 Alamar Blue 在 570 nm 波长的消光系数=80586；

E600=氧化型 Alamar Blue 在 600 nm 波长的消光系数=117216；

A570=检测孔在 570 nm 波长的吸光值；

A600=检测孔在 600 nm 波长的吸光值；

P570=阳性对照孔在 570 nm 波长的吸光值（不含待测药物的细胞+Alamar Blue）；

P600=阳性对照孔在 600 nm 波长的吸光值（不含待测药物的细胞+Alamar Blue）。

8.2 公式 4：通过荧光值来计算还原度变化百分比：

$$\text{Alamar Blue 还原度变化百分比 (\%)} = (\text{实验组 FI 590} / \text{阴性对照组 FI 590}) \times 100$$

FI 590=590 nm 发射波长（560nm 激发波长）下的荧光强度。

Technical Support

Copyright © 2023 CYTOCH, All Rights Reserved. The CYTOCH logo is a registered trademark.

To place an order or to obtain a product information, please go to: www.cytoch.com.

Or contact us by:

E-mail: support@cytoch.com

Tel: 400-969-8881

For research use only.

CYTOCH