上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话：021-61312973　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：shyysw@sina.com

Alamar Blue 阿尔玛蓝

检测原理：

阿尔玛蓝（Alamar Blue）是一种氧化还原指示剂，能根据代谢活性产生吸亮度变化和荧光信号。这是一种安全无毒的染料，可用于细胞活性和细胞增殖的定量分析以及细胞因子生物测定和体外细胞毒性研究，能有效测定动物、真菌和细菌细胞的天然代谢活性。Alamar Blue 在氧化状态下呈现紫蓝色无荧光性，而在还原状态下，转变为呈粉红或红色荧光的还原产物，反映所研究的细胞或微生物对氧分子的消耗，因而常被用作氧化还原指示剂，以显示被观察细胞和细菌的代谢活动。这种测定是基于具有代谢活性的细胞将试剂转换成荧光和比色指示剂的能力。在细胞增殖过程中，细胞内 NADPH/NADP、FADH/FAD、FMNH/FMN 和 NADH/NAD 的比值升高，处于还原环境。摄入细胞内的染料被这些代谢中间体及细胞色素类还原后释放到细胞外并溶于培养基中，使培养基从无荧光的靛青蓝变成有荧光的粉红色。受损和无活性细胞具有较低的天然代谢活性，因此对应的信号较低。可以用普通分光光度计或荧光光度计检测，其激发光波长在 530-560 nm 之间，发射光波长为 590 nm。吸光度和荧光强度与活性细胞数成正比。

本品可广泛地用于细胞增殖代谢，药物的细胞毒作用的体外测定以及病原微生物的的快速检测与鉴定。与台盼兰、TTC、MTT、MTS 等分析法相比，Alamar Blue 具有更多的优势。Alamar Blue 采用单一试剂，可以连续、快速地检测细胞的增生状态。由于 Alamar Blue 对细胞无毒、无害，不影响细胞的抗体合成与分泌等活性，因此可以对同一批细胞的增生状态进行连续观察和进一步的实验观察，因此有操作简便和几乎不干扰细胞正常代谢的特点。

运输与保存方法：

冰袋（wet ice）运输。产品 2-8℃ 避光保存，至少一年有效。

注意事项：

1. 需客户自行准备 100%还原型 Alamar Blue 试剂。为得到还原型 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. 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。

3. 合适密度的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 微升细胞，细胞浓度范围为：贴壁细胞在 100-10,000/孔，悬浮细胞在 2,000-50,000/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。

4. 整个过程均应为无菌操作，因为微生物污染物同样可以还原检测试剂而影响实验结果。

5. 注意接种细胞浓度和加入检测试剂后孵育时间。细胞浓度过高或孵育时间过长，会导致继发性还原反应，产生无色和荧光消失。

6. 孵育时，须避光。

7. 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。

操作说明：

一、制作标准曲线（测定最佳孵育时间和细胞数量）

1. 每孔加入 100 微升细胞悬液（对数生长期细胞），对细胞计数。按比例依次用培养基等比稀释成一个细胞浓度梯度，一般要做 3-5 个细胞浓度梯度，每个浓度建议 3-6 个复孔。注：设置阴性对照：细胞培养基中不加入细胞；阳性对照：100 微升 100%还原型 Alamar Blue（不含细胞）。

2. 每孔加入 10 微升 Alamar Blue。阳性对照孔中加入 10 微升无菌的超纯水。

3. 放入细胞培养箱内培养（37℃,5% CO2）一定时间。培养基的颜色由靛青蓝开始变成粉红色就可以进入下一步。

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。

5. 普通分光光度计在 570 nm 测定吸光度，参考波长 600nm。也可用 570/630 nm 和 540/600 nm 替代。

6. 绘制标准曲线。以细胞数量或孵育时间为横坐标（X 轴），Alamar Blue 还原率为纵坐标（Y 轴）。根据此标准曲线可以测定出适合的细胞数量或孵育时间（使用此标准曲线的前提是实验的条件要一致）。

二、细胞毒性和细胞增殖检测

1. 每孔加入 100 微升细胞悬液（对数生长期细胞），对细胞计数。建议细胞数量为 10^4/mL，具体每孔需要的细胞数量，需根据细胞类型决定。

2. 细胞中加入待检测药物，为检测药物对细胞增殖的作用，请设置合适的对照组，包括刺激细胞和非刺激细胞。

3. 混匀，放入细胞培养箱内孵育（37℃,5% CO2）一段时间。

4. 每孔加入 10 微升 Alamar Blue。阳性对照孔中加入 10 微升无菌的超纯水。

5. 放入细胞培养箱内孵育（37℃,5% CO2）4-8 h，最佳孵育时间取决于细胞类型。培养基的颜色由靛青蓝开始变成粉红色就可以进入下一步。

6. 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。

7. 普通分光光度计在 570nm 测定吸光度，参考波长 600 nm。也可用 570/630 nm 和 540/600 nm 替代。

活力计算：

1. 普通分光光度计检测

Alamar Blue 还原率（%）=[（E600×A570）-（E570×A600）]/[(E570′×C600)-E600′×C570] ×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 波长的吸亮度；

A600=检测孔在 600 nm 波长的吸亮度；

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 波长的吸亮度（培养基，Alamar Blue，无细胞）；

C600=阴性对照孔在 600 nm 波长的吸亮度（培养基，Alamar Blue，无细胞）；

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；

2. 荧光分光光度计检测

Alamar Blue 还原率（%）=（实验组 F590-阴性对照组 F590）/（100%还原型阳性对照 F590-阴性对照组 F590）×100 F590=590 nm 波长荧光值