

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-F009

产品规格: 48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器: 荧光酶标仪(激发波长 535 nm, 发射波长 587 nm)

Elabscience[®]二磷酸腺苷(ADP)荧光法测试盒

Adenosine Diphosphate (ADP) Fluorometric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血(浆)、动物组织及细胞样本中的二磷酸腺苷(ADP)的含量。

检测原理

二磷酸腺苷(Adenosine diphosphate, ADP), 也叫腺苷二磷酸, 是一种在能量转移反应中起关键作用的核苷。在生物体内, ADP 通常为三磷酸腺苷(Adenosine triphosphate, ATP)水解失去一个磷酸根, 即断裂一个高能磷酸键, 并释放能量后的产物。ADP 存在于血小板细胞的高密度颗粒内, 当血小板发生凝聚反应时被释放, ADP 通过血小板上的 ADP 受体对血小板的形状及生物学行为产生影响, 进一步加速血小板的凝聚过程。

本试剂盒的检测原理是: ADP 和底物通过酶试剂催化使得显色剂产生荧光, 在荧光酶标仪激发波长 535 nm, 发射波长 587nm 检测, 根据标准曲线计算样本中 ADP 含量。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	25 mL×1 瓶	50 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	粉剂×2 支	粉剂×4 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	0.5 mL×1 支	1 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	显色剂 (Chromogenic Agent)	0.15 mL×1 支	0.3 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	5 mmol/L 标准品溶液 (5 mmol/L Standard Solution)	0.5 mL×1 支	1 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	细胞裂解液 (Cell Lysis Buffer)	7 mL×1 瓶	14 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
	96 孔黑色酶标板	1 板		
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：荧光酶标仪(激发波长 535 nm，发射波长 587 nm)、37℃ 恒温箱

试剂：生理盐水(0.9%NaCl)

耗材：3 KD 超滤管

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 试剂二工作液的配制：

取一支试剂二，加入1 mL试剂一混匀溶解，避光待用，现配现用，4 h 内使用有效。

③ 测定工作液的配制：

将试剂一：试剂二工作液：试剂三按体积比=42：1：2配制，避光待用，现配现用。

④ 试剂四工作液的配制：

将试剂一：试剂四按体积比=23：2配制，避光待用，现配现用，一天内使用有效。

⑤ 50 μmol/L标准品的配制：

将生理盐水(0.9% NaCl)：试剂五按体积比= 99：1配制，避光待用，现配现用，当天使用有效。

⑥ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(μmol/L)	0	10	15	20	30	35	40	50
50 μmol/L 标准品(μL)	0	40	60	80	120	140	160	200
生理盐水(μL)	200	160	140	120	80	60	40	0

样本准备

① 样本处理

组织样本：按照组织样本质量(g)：生理盐水(0.9% NaCl)体积(mL)=1：9的比例匀浆，4°C，10000 ×g离心10 min。取100-500 μL上清，加入到3 KD超滤管，12000 ×g 离心15 min，收集滤液待测。

细胞样本：取 1×10^6 个细胞，加入200 μL试剂六，置于冰上裂解10 min，每5 min混匀一次。4°C，10000 ×g离心10 min。取上清，加入到3 KD超滤管，12000 ×g 离心15 min，收集滤液待测。

血清(浆)样本：取100-500 μL上清，加入到3 KD超滤管，12000 ×g离心15 min，收集滤液待测。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：2.8-50 μmol/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%小鼠肝组织	1-3	大鼠血清	不稀释
10%大鼠肾组织	1-3	1×10^6 个 Molt-4 细胞	不稀释
10%小鼠心组织	不稀释	1.2×10^6 个 HL-60 细胞	不稀释
10%大鼠肺组织	1-3	1×10^6 个 293T 细胞	不稀释
小鼠血浆	1-3	1.3×10^6 个 CHO 细胞	不稀释

注：稀释液为生理盐水(0.9% NaCl)。

操作步骤

- ① 标准孔:取 20 μL 不同浓度的标准品溶液,分别加入相应的酶标孔中。
测定孔: 取 20 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。
- ② 向步骤①中各孔加入 140 μL 测定工作液。
- ③ 向步骤②中各孔加入 20 μL 试剂四工作液。
- ④ 振板 5 s, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 40 min, 荧光酶标仪于激发波长 535 nm, 发射波长 587 nm 处检测各孔荧光值。

操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度的标准品溶液(μL)	20	--
待测样本(μL)	--	20
测定工作液(μL)	140	140
试剂四工作液(μL)	20	20
振板 5 s, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 40 min, 荧光酶标仪于激发波长 535 nm, 发射波长 587 nm 处检测各孔荧光值。		

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

① 血清(浆)中 ADP 含量计算公式:

$$\text{ADP 含量} \begin{matrix} (\mu\text{mol/L}) \end{matrix} = (\Delta F - b) \div a \times f$$

② 组织样本中 ADP 含量计算公式:

$$\text{ADP 含量} \begin{matrix} (\mu\text{mol/kg wet weight}) \end{matrix} = (\Delta F - b) \div a \div \frac{m}{V} \times f$$

③ 细胞样本中 ADP 含量计算公式:

$$\text{ADP 含量} \begin{matrix} (\mu\text{mol}/10^6) \end{matrix} = (\Delta F - b) \div a \div \frac{n}{V} \times f$$

注解:

y: 标准品荧光值-空白荧光值(标准品浓度为 0 时的荧光值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔF : 测定孔荧光值-空白荧光值(标准品浓度为 0 时的荧光值)

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

m: 组织湿重质量, g

n: 细胞样本数量, 10^6

V: 样本匀浆液体积, mL

附录1 关键数据

1. 技术参数

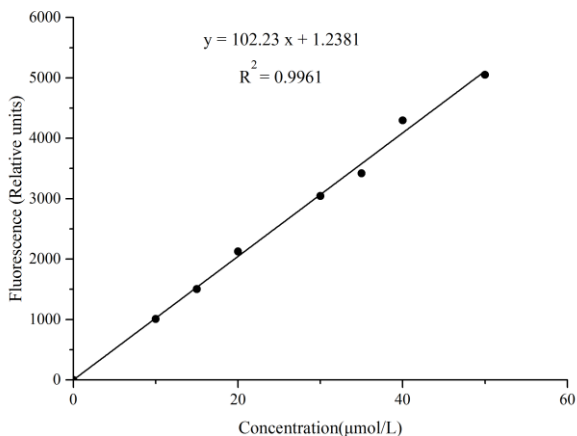
检测范围	2.8-50 $\mu\text{mol/L}$	批间差	4.4-9.6%
灵敏度	2.8 $\mu\text{mol/L}$	批内差	4.0-5.0%
加标回收率	95-97%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量20 μL ，按照操作步骤进行实验，荧光值如下表所示：

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	10	15	20	30	35	40	50
荧光值	1719	2830	3324	3906	4762	4878	6056	6676
	1816	2727	3217	3886	4867	5499	6074	6963
平均荧光值	1768	2778	3271	3896	4814	5188	6065	6819
绝对荧光值	0	1010	1503	2128	3046	3420	4297	5051

② 绘制标曲(如下图):



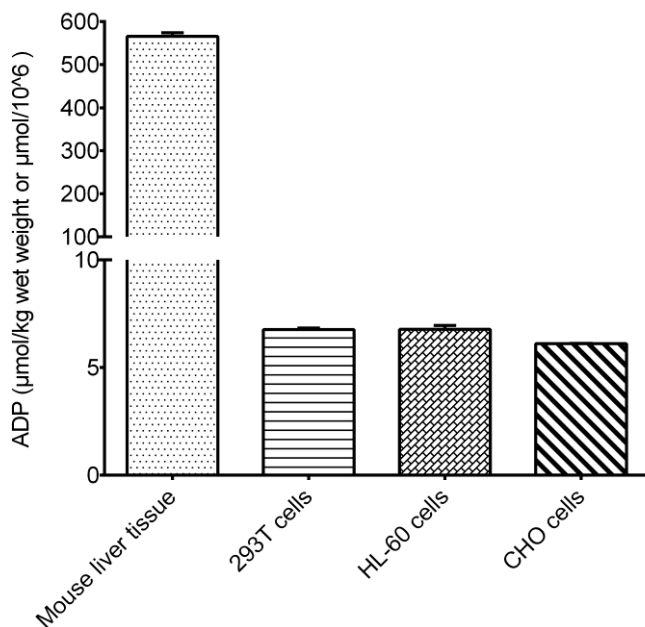
附录2 实例分析

例如小鼠肝组织(数据仅供参考):

取20 μL 稀释2倍的10 %小鼠肝组织匀浆,按操作表操作,结果如下:测定孔的荧光值为4983,空白荧光值为1335, $\Delta F = 4983 - 1335 = 3648$ 。标准曲线为: $y = 102.23 x + 1.2381$, 计算结果为:

$$\text{ADP含量} \quad (\mu\text{mol/kg wet weight}) = (3648 - 1.2381) \div 102.23 \div \frac{0.1}{0.9} \times 2 = 642.10 \mu\text{mol/kg wet weight}$$

按说明书操作,10%小鼠肝组织(稀释倍数为2倍,加样量20 μL)、293T细胞(1×10^6 个,加样量20 μL)、HL-60细胞(1.2×10^6 个,加样量20 μL)、CHO细胞(1.3×10^6 个,加样量20 μL)中的ADP含量(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
标准品不成线性	标准品放置太久导致标准品降解	重新稀释新的标准品
	测定工作液放置太久，酶活降低	重新配制测定工作液，测定工作液配制好后及时使用

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

