

(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

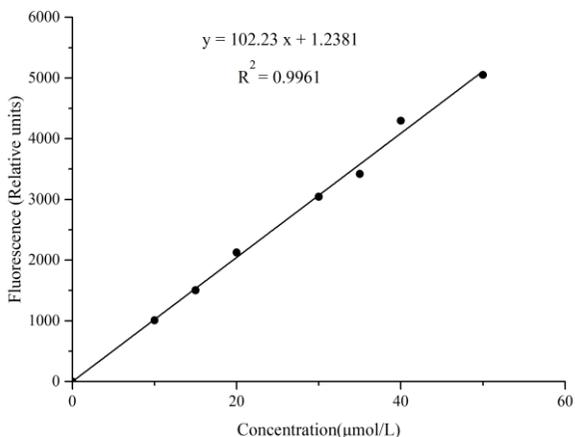
| | | | |
|-------|--------------------------|-----|----------|
| 检测范围 | 2.8-50 $\mu\text{mol/L}$ | 批间差 | 4.4-9.6% |
| 灵敏度 | 2.8 $\mu\text{mol/L}$ | 批内差 | 4.0-5.0% |
| 加标回收率 | 95-97% | | |

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):



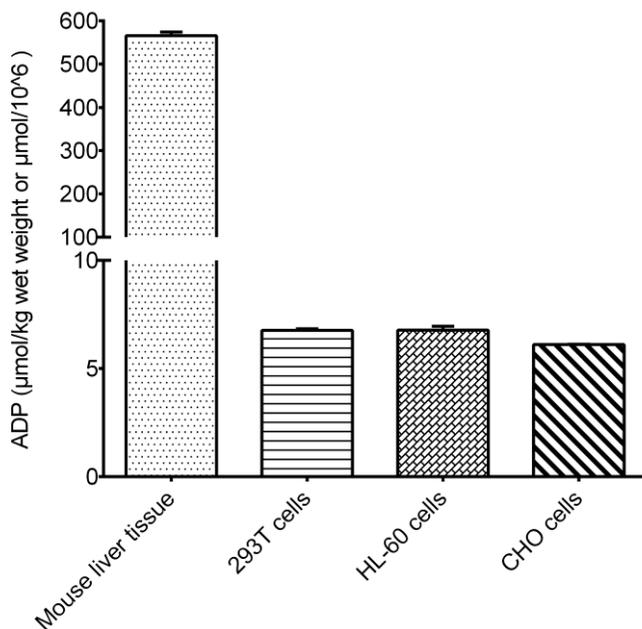
附录2 实例分析

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: $y = 102.23x + 1.2381$, 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。

