

(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-K157-M

产品规格: 48T(22 samples)/96T(46 samples)

检测仪器: 酶标仪(630-640 nm)

Elabscience® ATP 含量比色法测试盒

ATP Colorimetric 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动物组织样本中 ATP 的含量。

检测原理

肌酸激酶催化肌酸和 ATP 反应生成磷酸肌酸，通过比色法检测磷酸肌酸的含量，以此反应出 ATP 的含量。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size1)(48 T)	规格 2 (Size2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extracting Solution)	30 mL×1 瓶	60 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	缓冲液 (Buffer Solution)	12 mL×1 瓶	24 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃ 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	蛋白沉淀剂 (Protein Precipitator)	3 mL×1 瓶	6 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	显色剂 A (Chromogenic Agent A)	6 mL×1 瓶	12 mL×1 瓶	2-8℃ 避光 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	显色剂 B (Chromogenic Agent B)	2 mL×1 瓶	4 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂八 (Reagent 8)	终止剂 (Stop Solution)	6 mL×1 瓶	12 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂九 (Reagent 9)	标准品 (Standard)	粉剂×2 支	粉剂×4 支	2-8℃ 保存 6 个月
	96 孔酶标板	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，不同试剂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：酶标仪（630-640 nm，最适检测波长 636 nm）、水浴锅(100℃)

试剂准备

① 检测前，所有的试剂平衡至室温。

② 试剂二工作液的配制：

向试剂二中加入6 mL双蒸水，拧紧瓶盖，放入沸水中水浴使其完全溶解；若使用前有结晶析出，可沸水浴溶解后，放置37℃保存待用。未用完部分，2-8℃保存7天。

③ 试剂四工作液的配制：

取1.8 mL双蒸水加入到试剂四中，充分溶解后放置冰盒上待用。未用完部分，-20℃保存7天。

④ 对照工作液的配制：

按试剂二工作液：试剂三：双蒸水=100：200：30的比例配制，现用现配，按需配制。

测定工作液的配制：

按试剂二工作液：试剂三：试剂四工作液=100：200：30的比例配制，现用现配，按需配制。

⑤ 显色剂工作液配制：

按试剂六：试剂七=3：1配制，37℃放置1h，现用现配，按需配制。

⑥ 10 mmol/L ATP标准品储备液：

取一支试剂九加入1 mL双蒸水，充分混匀溶解，-20℃保存7天。

⑦ 1 mmol/L ATP标准品：

按10 mmol/L ATP标准品储备液：双蒸水=1：9配制，即10倍稀释，-20℃保存7天。

样本准备

① 样本处理

组织样本处理：准确称取 0.1 g 组织样本，并剪碎放入 2 mL EP 管中(或经多次清洗的试管)，加入 0.9 mL 试剂一提取液，在冰水浴条件下，60 Hz，90 s 研磨制成组织匀浆，并沸水浴 2 min，流水冷却后，4℃，10000 ×g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择差异较大的2-3例样本稀释成不同浓度进行预实验，结合检测范围：0.03-1.5 mmol/L，不同样本的稀释如下表(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%大鼠肌肉组织	2-4	10%大鼠肾脏组织	2-4
10%大鼠肝脏组织	2-4	10%大鼠肺组织	2-4
10%大鼠脑组织	2-4		

注：稀释液为双蒸水。

实验关键点

- ① 使用的实验器具应多次冲洗(10次左右)，避免磷污染。
- ② 取用显色剂时，应倒出部分使用，避免试剂被污染。
- ③ 需要使用新鲜样本。
- ④ 测定孔 OD 值大于 1 时，需要加大稀释倍数，重新检测。

操作步骤

酶促反应

- ① 空白管、标准管：取 30 μL 的 1 mmol/L 标准品，加入到 1.5 mL EP 管中；
对照管、测定管：取 30 μL 样本上清，加入 1.5 mL EP 管中。
- ② 向空白管、对照管加入 330 μL 对照工作液。
- ③ 向标准管、测定管加入 330 μL 测定工作液。
- ④ 混匀后，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。
- ⑤ 向④中各管加入 50 μL 试剂五。
- ⑥ 混匀 3 s 后，10000 $\times g$ 离心 5 min，取反应液上清待测。

显色反应

- ① 取 60 μL 反应液上清，加入到对应的酶标孔中。
- ② 向步骤①各孔加入 100 μL 显色剂工作液。
- ③ 酶标仪上振板 5 s，室温静置 2 min。
- ④ 向步骤③中各孔加入 100 μL 试剂八。
- ⑤ 酶标仪上振板 5 s，室温静置 5 min，酶标仪 636 nm 处，测各孔 OD 值。

操作表

酶促反应

	空白管	标准管	对照管	测定管
1 mmol/L 标准品(μL)	30	30	--	--
样本上清(μL)	--	--	30	30
对照工作液(μL)	330	--	330	--
测定工作液(μL)	--	330	--	330
混匀, 37℃ 孵育 30 min				
试剂五(μL)	50	50	50	50
混匀 3 s 后, 10000 ×g 离心 5 min, 取反应液上清待测				

显色反应

	空白孔	标准孔	对照孔	测定孔
反应液上清(μL)	60	60	60	60
显色剂工作液(μL)	100	100	100	100
酶标仪上振板 5 s, 室温静置 2 min				
试剂八(μL)	100	100	100	100
酶标仪上振板 5 s, 室温静置 5 min, 酶标仪 636 nm 处, 测各孔 OD 值。				

结果计算

组织中 ATP 含量:

$$\text{ATP 含量} \quad (\text{mmol/kg 组织湿重}) = \frac{\text{测定 OD 值} - \text{对照 OD 值}}{\text{标准 OD 值} - \text{空白 OD 值}} \times c \div \frac{m}{V_1} \times f$$

注解:

c: 标准品浓度为 1 mmol/L

m: 组织的鲜重(g), 建议 m 取 0.1 g

V₁: 组织处理过程中加入试剂一的体积(mL), 建议取 0.9 mL

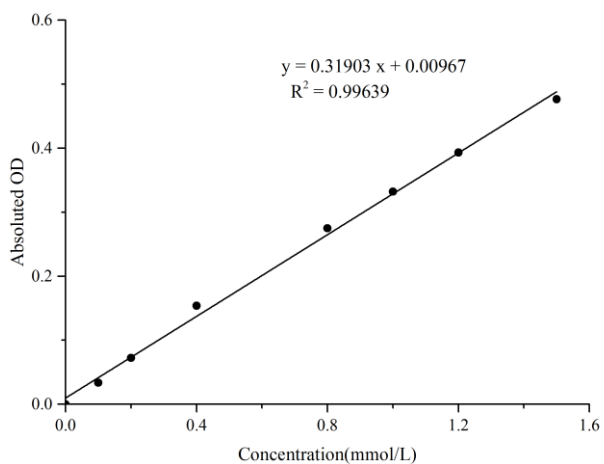
f: 样本加入检测体系之前的稀释倍数

附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	0.03-1.5 mmol/L	平均批间差	5.4 %
灵敏度	0.01 mmol/L	平均批内差	5.1 %
平均回收率	94%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)



附录2 实例分析

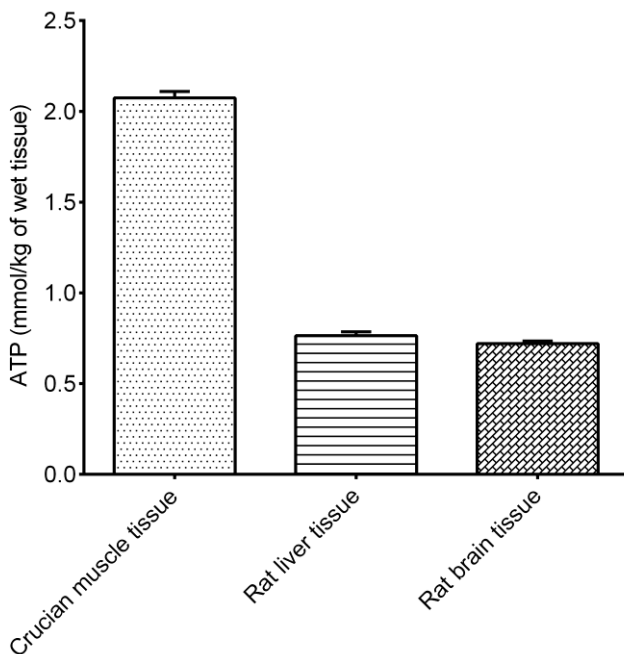
例如检测鲫鱼肌肉组织(数据仅供参考):

取鲫鱼肌肉组织,按说明书处理后,用双蒸水稀释3倍,按操作表检测,结果如下:

空白管平均OD值为0.104,标准管平均OD值为0.526,测定管平均OD值为0.931,对照管平均OD值为0.899,计算结果为:

$$\text{ATP (mmol/kg 组织湿重)} = \frac{0.931 - 0.899}{0.526 - 0.104} \times 1 \div 0.1 \times 0.9 \times 3 = 2.05 \text{ mmol/kg 组织湿重}$$

按照说明书操作,测定鲫鱼肌肉(稀释3倍,加样量30 μL)、大鼠肝脏(稀释3倍,加样量30 μL)、大鼠脑(稀释3倍,加样量30 μL)中ATP含量(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
复孔差异大	未严格按照说明书操作	严格按照说明书操作
空白管 OD 值高	反应体系被污染	多次冲洗实验器具
样本测不出值	样本稀释倍数太大	选择合适稀释倍数,重新检测
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本,重新检测
样本测量结果>1.5 mmol/L	样本浓度太高	选择合适稀释倍数,重新检测

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。

附录4 客户发表文献

1. Du S, Zhou N, Xie G, et al. Surface-engineered triboelectric nanogenerator patches with drug loading and electrical stimulation capabilities: Toward promoting infected wounds healing[J]. *Nano Energy*, 2021, 85:106004. IF:17.087
2. Bartolini D, Arato I, Mancuso F, et al. Melatonin modulates Nrf2 activity to protect porcine pre-pubertal Sertoli cells from the abnormal H₂O₂ generation and reductive stress effects of cadmium. *J Pineal Res.* 2022;73 (1):e12806. IF:13.007
3. Yang Z, Wang J, Ai S, et al. Self-generating oxygen enhanced mitochondrion-targeted photodynamic therapy for tumor treatment with hypoxia scavenging[J]. *Theranostics*, 2019, 9(23): 6809. IF:11.556
4. Wan Q, Cao R, Wen G, et al. Sequential use of UV-LEDs irradiation and chlorine to disinfect waterborne fungal spores: Efficiency, mechanism and photoreactivation[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 423:127102-. IF:10.588
5. Tian J, Wang L, Hui S, et al. Cadmium accumulation regulated by a rice heavy-metal importer is harmful for host plant and leaf bacteria. *J Adv Res.* 2022. IF:10.479
6. Jg A, Jie S B, Jy B, et al. Comparative toxicity reduction potential of UV/sodium percarbonate and UV/hydrogen peroxide treatments for bisphenol A in water: An integrated analysis using chemical, computational, biological, and metabolomic approaches[J]. *Water Research*, 2020, 190. IF:9.702
7. Yang X X, Xu X, Wang M F, et al. A nanoreactor boosts chemodynamic therapy and ferroptosis for synergistic cancer therapy using molecular amplifier dihydroartemisinin[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2022, 20(1):1-19. IF:9.464
8. Liu Z, Liu X, Yang Q, et al. Neutrophil membrane-enveloped nanoparticles for the amelioration of renal ischemia-reperfusion injury in mice[J]. *Acta Biomaterialia*, 2020, 104: 158-166. IF:8.947
9. Huang S, Le H, Hong G, et al. An all-in-one biomimetic iron-small interfering RNA nanoplatform induces ferroptosis for cancer therapy. *Acta Biomater.* 2022;148:244-257. IF:8.291
10. Alharbi YM, Sakr SS, Albarrak SM, et al. Antioxidative, Antidiabetic, and Hypolipidemic Properties of Probiotic-Enriched Fermented Camel Milk Combined with *Salvia officinalis* Leaves Hydroalcoholic Extract in Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11 (4):. IF:7.675
11. Wang H, Huang Q, Zhang Z, et al. Transient post-operative overexpression of CXCR2 on

- monocytes of traumatic brain injury patients drives monocyte chemotaxis toward cerebrospinal fluid and enhances monocyte-mediated immunogenic cell death of neurons in vitro[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2022. IF:7.573
12. Liu P, Yin Z, Chen M, et al. Cytotoxicity of adducts formed between quercetin and methylglyoxal in PC-12 cells[J]. *Food Chemistry*, 2021, 352(2):129424. IF:7.514
 13. Adhikari B, Adhikari M, Ghimire B, et al. Cold plasma seed priming modulates growth, redox homeostasis and stress response by inducing reactive species in tomato (*Solanum lycopersicum*)[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2020, 156: 57-69. IF:7.376
 14. Zhao X, Wang C, Dai S, et al. Quercetin Protects Ethanol-Induced Hepatocyte Pyroptosis via Scavenging Mitochondrial ROS and Promoting PGC-1 α -Regulated Mitochondrial Homeostasis in L02 Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:4591134. IF:7.31
 15. Chagas TQ, Freitas N, Montalvão MF, Nobrega RH, Machado MRF, Charlie-Silva I, Araújo APDC, Guimarães ATB, Alvarez TGDS, Malafaia G. Multiple endpoints of polylactic acid biomicroplastic toxicity in adult zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Chemosphere*. 2021 Aug;277:130279. IF:7.086
 16. Mlindeli Gamede, Lindokuhle Mabuza, Phikelelani Ngubane, et al. Preventing the onset of diabetes-induced chronic kidney disease during prediabetes: The effects of oleanolic acid on selected markers of chronic kidney disease in a diet-induced prediabetic rat model[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021 Jul;139:111570. IF:6.529
 17. Yang H, Zhu Y, Ye Y, et al. Nitric oxide protects against cochlear hair cell damage and noise-induced hearing loss through glucose metabolic reprogramming.[J]. *Free radical biology & medicine*, 2021. IF:6.525
 18. Rao M J, Xu Y, Tang X, et al. CsCYT75B1, a Citrus CYTOCHROME P450 Gene, Is Involved in Accumulation of Antioxidant Flavonoids and Induces Drought Tolerance in Transgenic Arabidopsis[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2020, 9(2):161. IF:6.313
 19. Liou G G, Hsieh C C, Lee Y J, et al. N-Acetyl Cysteine Overdose Inducing Hepatic Steatosis and Systemic Inflammation in Both Propacetamol-Induced Hepatotoxic and Normal Mice[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(3):442. IF:6.312
 20. Wang Y, Chi H, Xu F, et al. Cadmium chloride-induced apoptosis of HK-2 cells via interfering with mitochondrial respiratory chain[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 236:113494-. IF:6.233

