（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-K774-M

产品规格：96T(40 samples)

检测仪器：酶标仪(450-470 nm)

Elabscience®ATP 含量比色法测试盒（酶法）

ATP Colorimetric Assay Kit (Enzyme Method)

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三磷酸腺苷(ATP)的含量。

检测原理

三磷酸腺苷(Adenosine Triphosphate，ATP)是一种高能磷酸化合物，是生物体内最直接的能量来源，其含量变化直接关系到生物体内的能量代谢状态。己糖激酶(Hexokinase，HK)催化葡萄糖和 ATP 生成葡萄糖-6-磷酸，葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase，G6PD)进一步催化葡萄糖-6-磷酸脱氢生成 NADPH。NADPH 可与显色剂反应，产物在 460 nm 有特征吸收峰，以此来测定 ATP 含量。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extraction Solution)	50 mL×2 瓶	-20°C保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	酶稀释液 (Enzyme Diluent)	8 mL×1 瓶	-20°C保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	酶试剂 A (Enzyme Reagent A)	粉剂×1 支	-20°C避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	酶试剂 B (Enzyme Reagent B)	0.2 mL×1 支	-20°C避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	酶试剂 C (Enzyme Reagent C)	0.2 mL×1 支	-20°C避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	显色剂 (Chromogenic Agent)	6 mL×1 瓶	-20°C避光 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	100 μmol/L 标准品 (100 μmol/L Standard Solution)	1.5 mL×2 支	-20°C保存 6 个月
	96 孔酶标板	96 孔×1 块	无要求
	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：酶标仪(450-470 nm，最佳检测波长 460 nm)，水浴锅，恒温箱。

试剂准备

① 检测前，试剂三置于冰盒上待用，其余试剂平衡至室温(25°C)。

② 试剂三应用液的配制：

每支试剂三粉剂加入1 mL双蒸水溶解，混匀得到试剂三应用液，未用完的试剂三应用液可-20°C避光保存1个月。

③ 试剂三工作液的配制：

将试剂三应用液：双蒸水按体积比=1：14配制得到试剂三工作液。现配现用，-20°C保存，当天使用有效。

④ 试剂四工作液的配制：

每支试剂四用2.3 mL试剂二稀释混匀。未用完的试剂四工作液-20°C避光保存1个月。

⑤ 试剂五工作液的配制：

每支试剂五用3.3 mL试剂二稀释混匀。未用完的试剂五工作液-20°C避光保存1个月。

⑥ 40 μmol/L标准品溶液的配制：

将试剂七：试剂一按体积比=1：1.5配制，按需配制，未用完的40 μmol/L标准品可-20°C保存一个月。

⑦ 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**	**5**	**10**	**15**	**20**	**25**	**30**	**40**
40 μmol/L 标准品(μL)	0	100	200	300	400	500	600	800
试剂一(μL)	800	700	600	500	400	300	200	0

实验关键点

需要使用新鲜的组织样本。

样本准备

① 样本处理

动物组织样本：试剂一预冷至2-8°C。按照组织样本质量(g)：试剂一体积(mL)为1:9的比例(如0.1 g组织样本，加入0.9 mL试剂一)，于4°C条件下进行机械匀浆。将所得组织匀浆沸水浴3 min，流水冷却至室温(25°C)，4°C，10000 × g离心10 min，取上清至于冰(盒)上待测。

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：0.72-40.00 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%小鼠心组织	不稀释	10%小鼠肝组织	不稀释
10%小鼠肾组织	不稀释	10%小鼠脑组织	不稀释
10%小鼠肌肉组织	不稀释	10%鱼肌肉组织	不稀释

注：稀释液为试剂一。

操作步骤

① 标准孔：取 100 μL 不同浓度的标准品溶液加入相应的板孔中。
测定孔、对照孔：取 100 μL 待测样本加入相应的板孔中。

② 向步骤①中各孔加入 50 μL 试剂三工作液。

③ 标准孔、测定孔：加入 50 μL 试剂五工作液。
对照孔：加入 50 μL 试剂四工作液。

④ 向步骤③中各孔加入 50 μL 试剂六。

⑤ 振板 5 s，37°C 孵育 5 min，酶标仪 460 nm 处，测定各孔 OD 值。

操作表

	标准孔	测定孔	对照孔
不同浓度标准品(μL)	100	--	--
待测样本(μL)	--	100	100
试剂三工作液(μL)	50	50	50
试剂五工作液(μL)	50	50	--
试剂四工作液(μL)	--	--	50
试剂六(μL)	50	50	50
振板 5 s，37°C 孵育 5 min，酶标仪 460 nm 处，测定各孔 OD 值。			

结果计算

标准品拟合曲线： $y = a x + b$

组织样本中 ATP 含量计算公式：

$$\text{ATP 含量 (μmol/kg wet weight)} = \frac{\Delta A - b}{a} \times f \div \frac{m}{V}$$

注解：

y：标准孔 OD 值-空白孔 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x：标准品的浓度

a：标曲的斜率

b：标曲的截距

ΔA：测定孔 OD 值-对照孔 OD 值

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

m：样本质量，0.1 g

V：组织匀浆时加入试剂一的体积，0.9 mL

附录1 关键数据

1. 技术参数

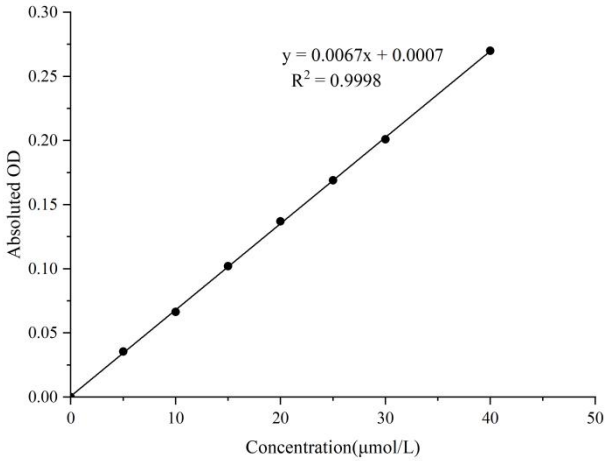
检测范围	0.72-40.00 μmol/L	批间差	1.7-6.4%
灵敏度	0.72 μmol/L	批内差	1.5-2.2%
加标回收率	94-111%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量100 μL，按照操作步骤进行实验，OD值如下表所示：

标准品浓度(μmol/L)	0	5	10	15	20	25	30	40
OD 值	0.070	0.103	0.135	0.171	0.207	0.238	0.271	0.341
	0.068	0.106	0.136	0.171	0.205	0.238	0.269	0.337
平均 OD 值	0.069	0.105	0.136	0.171	0.206	0.238	0.270	0.339
绝对 OD 值	0.000	0.036	0.067	0.102	0.137	0.169	0.201	0.270

② 绘制标曲(如下图)：



附录2 实例分析

例如检测鱼肌肉(数据仅供参考):

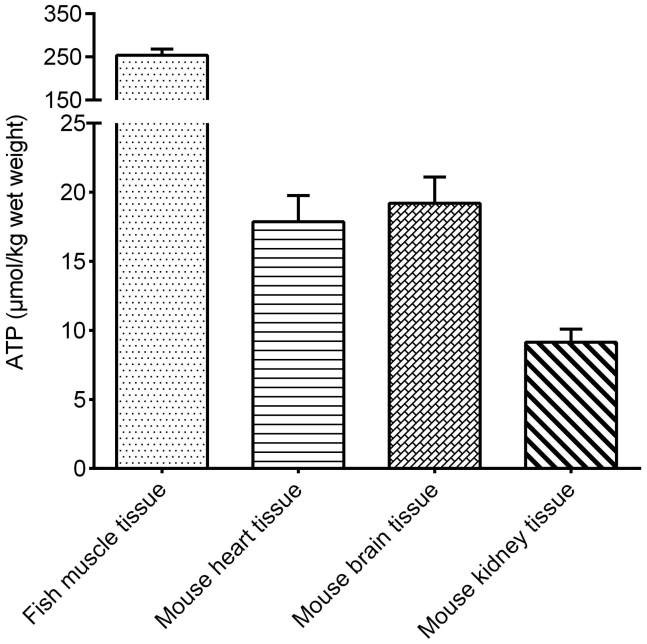
取 100 μL 10%鱼肌肉组织样本，按操作表操作，结果如下：

标准曲线 y = 0.0067 x + 0.0007，测定孔 OD 值为 0.432，对照孔 OD 值为 0.243，ΔA = 0.432 - 0.243 = 0.189 计算结果为：

$$\text{ATP含量}(\mu\text{mol/kg wet weight}) = (0.189 - 0.0007) \div 0.0067 \div 0.1 \times 0.9$$

$$= 252.94\ \mu\text{mol/kg wet weight}$$

按照说明书操作，测定 10%鱼肌肉组织（加样量 100 μL）、10%小鼠心组织（加样量 100 μL）、10%小鼠脑组织（加样量 100 μL）、10%小鼠肾组织（加样量 100 μL）中 ATP 的含量（如下图）：



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。