

(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-F300

产品规格：48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器：化学发光检测仪

Elabscience[®] ATP 含量化学发光法 测试盒（双试剂）

ATP Chemiluminescence Assay Kit (Double Reagent)

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

本试剂盒适用于细胞样本中 ATP 含量的检测。

检测原理

荧光素酶与荧光素结合，在 ATP 和氧气的存在下发生氧化反应，释放出荧光。当荧光素酶和荧光素都过量时，在一定范围内光信号的强度与 ATP 含量成正比。

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)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 3 个月
试剂二 (Reagent 2)	酶稀释液 (Enzyme Diluent)	7 mL×1 瓶	14 mL×1 瓶	-20°C 保存 3 个月
试剂三 (Reagent 3)	100 μmol/L 标准品 (100 μmol/L Standard Solution)	1 mL×1 支	1 mL×1 支	-20°C 保存 3 个月
	黑色酶标板	96 孔×1 块		无要求
	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：化学发光检测仪或多功能酶标仪（具有检测化学发光的功能）

试剂：PBS（0.01 M，pH 7.4）

试剂准备

① 检测前，试剂一置于冰(盒)上待用，其余试剂平衡至室温(25°C)。

② 酶储备液的配制：

每支试剂一加入1 mL试剂二溶解，分装后于-20°C可避光保存一周。

③ 工作液的配制：

按酶储备液：试剂二体积比=1：5配制，按需配制，现用现配，8 h内使用有效。

④ 1 $\mu\text{mol/L}$ 标准品的配制：

按试剂三：PBS (0.01 M, pH 7.4) 体积比=1：99 稀释成 1 $\mu\text{mol/L}$ 标准品，现用现配，8 h内使用有效。

⑤ 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($\mu\text{mol/L}$)	0	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	1.0
1 $\mu\text{mol/L}$ 标准品 (μL)	0	25	50	100	200	400	800	1000
PBS (μL)	1000	975	950	900	800	600	200	0

样本准备

① 样本处理

细胞样本：4°C，300 × g离心5 min，弃掉培养基，收集细胞沉淀；加入PBS（0.01 M，pH 7.4），轻轻吹打洗涤细胞；4°C，300 × g离心5 min，弃掉上清液，收集细胞沉淀，加入PBS（0.01 M，pH 7.4）将细胞重悬至 1×10^5 /mL。

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：0.002-1 μ mol/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
1×10^4 个 Jurkat 细胞	不稀释	1×10^4 个 HL-60 细胞	不稀释
1×10^4 个 RAW 264.7 细胞	不稀释	1×10^4 个 HeLa 细胞	不稀释

注：稀释液为 PBS（0.01 M，pH 7.4）。

实验关键点

一次性检测孔（包含标准孔）的数量需控制在30个以下。

操作步骤

- ① 标准孔：取 100 μL 不同浓度的标准品加入到对应的板孔中；
测定孔：取 100 μL 细胞悬液加入到对应的板孔中。
- ② 向①中各孔加入 100 μL 工作液。
- ③ 立即测定各孔发光值，记为 L。

操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度的标准品(μL)	100	--
细胞悬液(μL)	--	100
工作液(μL)	100	100
立即测定各孔发光值，记为 L		

结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

细胞样本中 ATP 含量计算公式：

$$\text{ATP 含量} \begin{matrix} (\mu\text{mol}/1 \times 10^8) \end{matrix} = (\Delta L - b) \div a \div n$$

注解：

y：标准孔发光值-空白孔发光值(标准品浓度为 0 时的发光值)

x：标准品的浓度

a：标曲的斜率

b：标曲的截距

ΔL ：测定孔发光值-空白孔发光值

n：细胞浓度， $1 \times 10^8/\text{L}$

附录1 关键数据

1. 技术参数

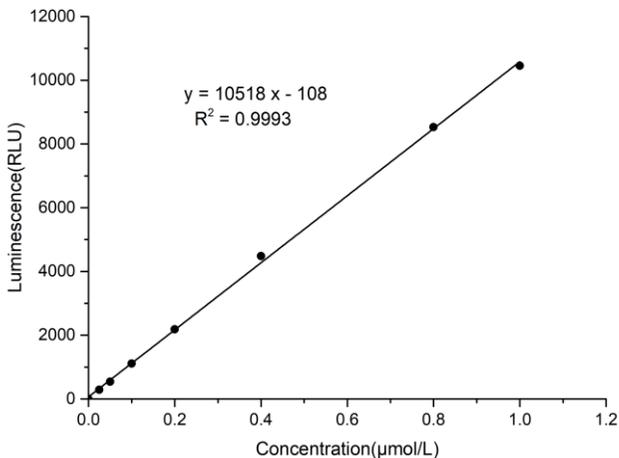
检测范围	0.002-1 $\mu\text{mol/L}$	批间差	3.4-5.2%
灵敏度	0.002 $\mu\text{mol/L}$	批内差	1.7-2.6%
加标回收率	96-99%		

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，发光值如下表所示：

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	1.0
发光值	88	380	625	1220	2237	4563	8593	10540
	80	371	628	1175	2304	4571	8642	10542
平均发光值	84	376	627	1198	2271	4567	8618	10541
绝对发光值	0	292	543	1114	2187	4483	8534	10457

② 绘制标曲(如下图)：



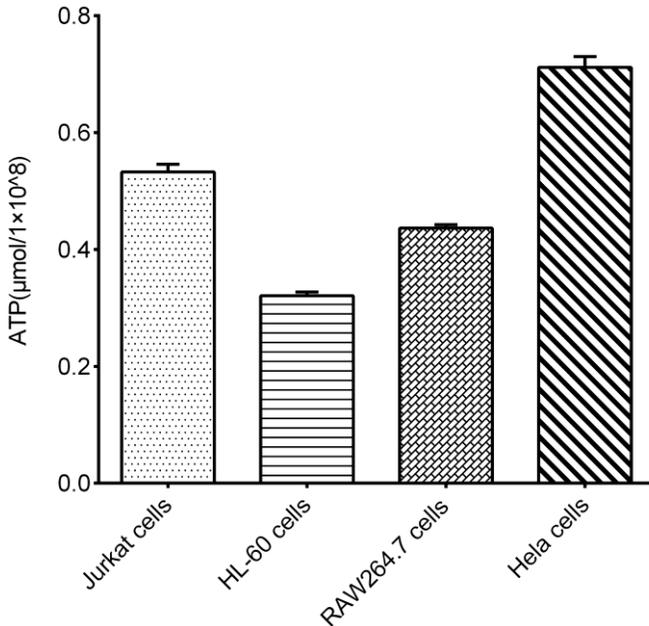
附录2 实例分析

例如检测Jurkat细胞(数据仅供参考):

取 100 μL 1×10^5 个/mL Jurkat 细胞, 按操作表操作, 结果如下: 标准曲线 $y = 10420x + 93$, 空白孔发光值为 28, 测定孔发光值为 5645。计算结果为:

$$\text{ATP含量}(\mu\text{mol}/1 \times 10^8) = (5645 - 28 - 93) \div 10420 \div 1 = 0.53 \mu\text{mol}/1 \times 10^8$$

按照说明书操作, 测定 Jurkat 细胞($1 \times 10^5/\text{mL}$, 加样量 100 μL)、HL-60 细胞($1 \times 10^5/\text{mL}$, 加样量 100 μL)、RAW264.7 细胞($1 \times 10^5/\text{mL}$, 加样量 100 μL)、Hela 细胞($1 \times 10^5/\text{mL}$, 加样量 100 μL)中的 ATP 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。