（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-K831-M

产品规格：96T(40 samples)

检测仪器：酶标仪(630-650 nm)

Elabscience® ATP 酶比色法测试盒

ATPase Activity 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及细胞样本中 ATP 酶的活力。

检测原理

ATP 酶又称为三磷酸腺苷酶，能够维持细胞膜电位和离子的平衡，是生物体内重要的高能化合物。ATP 酶将三磷酸腺苷(ATP)催化水解为二磷酸腺苷(ADP)和无机磷，然后通过定磷法确定单位时间内生成无机磷的含量来确定酶活大小。

本试剂盒检测组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

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)	缓冲液 (Buffer Solution)	30 mL×1 瓶	2-8°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	粉剂×1 瓶	2-8°C 避光保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	酸试剂 (Acid Reagent)	25 mL×1 瓶	2-8°C 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	显色剂 A (Chromogenic Agent A)	12 mL×1 瓶	2-8°C 避光保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	显色剂 B (Chromogenic Agent B)	4 mL×1 瓶	2-8°C 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	10 mmol/L 标准品 (10 mmol/L Standard)	0.5 mL×1 支	2-8°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(630-650 m，最佳检测波长 640 m) ，恒温箱(37°C)、匀浆机、低温离心机

试剂：双蒸水，0.9%生理盐水

试剂准备

① 检测前，所有的试剂平衡至室温。

② 试剂二工作液配制：

取一瓶试剂二，加入10 mL双蒸水溶解，2-8°C避光可保存7天。

③ 显色工作液的配制：

取试剂四：试剂五按体积比=3: 1混匀，37°C放置1 h，按需配制，避光保存，10 h内使用完毕。

④ 0.1 mmol/L标准品配制：

将试剂六与双蒸水按1: 99体积比进行稀释，按需配制，2-8°C保存。

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(mmol/L)	**0**	**0.01**	**0.02**	**0.03**	**0.05**	**0.06**	**0.08**	**0.1**
0.1 mmol/L 标准品(μL)	0	20	40	60	100	120	160	200
双蒸水(μL)	200	180	160	140	100	80	40	0

样本准备

① 样本处理

组织样本处理：组织处理的匀浆介质为生理盐水(0.9% NaCl)，若离心后上清液浑浊，可将上清反复离心至清澈，取上清待用，留取部分上清用于蛋白浓度测定。

细胞样本处理：将收集好的细胞(10^6)与生理盐水(0.9% NaCl) (mL)按照

5: 1 比例进行匀浆，4°C，10000 × g，离心 10 min 取上清待测，留取部分上清用于蛋白浓度测定。

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：0.06-2.75 U/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%大鼠肝组织	5-10	10%大鼠肾组织	5-10
10%大鼠心组织	5-10	10%大鼠脾组织	5-10
10%大鼠肺组织	5-10	10%大鼠肝组织	5-10
10%小鼠脾组织	5-10	10%小鼠肺组织	5-10
10%小鼠肾组织	5-10	293T 细胞	不稀释

注：稀释液为生理盐水(0.9%NaCl)。

实验关键点

① 所用实验器具多次冲洗(10 次左右)，避免外部磷污染。

② 测定绝对 OD 值大于 0.5 时，需要增加稀释倍数重新检测。

③ 尽可能使用新鲜组织样本和活细胞进行测试。

操作步骤

酶促反应

① 对照管和测定管：取 160 μL 双蒸水加入到 1.5 mL 的 EP 管中。

② 向步骤①中的测定管加入 100 μL 样本上清。

③ 向对照管和测定管中各加入 260 μL 试剂一。

④ 向步骤③各管加入 80 μL 试剂二工作液。

⑤ 混匀，37°C 孵育 30 min。

⑥ 向步骤⑤各管加入 100 μL 试剂三，混匀。

⑦ 向对照管加入 100 μL 样本上清，混匀，3500 r/min 离心 10 min，取反应上清待测。

显色反应

① 标准孔：取 30 μL 不同浓度标准品加入到相应酶标孔中。

对照孔、测定孔：取 30 μL 反应上清液加入到相应酶标板孔中。

② 向步骤①中各酶标孔加入 100 μL 显色工作液。

③ 酶标仪振板 5 s，室温静置 2 min。

④ 向步骤③各酶标孔加入 100 μL 试剂三。

⑤ 酶标仪振板 5 s，室温避光孵育 10 min，酶标仪 640 nm 处测定各孔 OD 值。

操作表

酶促反应

	对照孔	测定孔
双蒸水(μL)	160	160
样本上清(μL)	--	100
试剂一(μL)	260	260
试剂二工作液(μL)	80	80
混匀，37℃ 孵育 30 min		
试剂三(μL)	100	100
样本上清(μL)	100	
混匀 3 s，3500 r/min 离心 10 min，取反应上清待测。		

显色反应

	标准孔	对照孔	测定孔
不同浓度标准品(μL)	30	--	--
反应上清(μL)	--	30	30
显色剂工作液(μL)	100	100	100
酶标仪振板 5 s，室温静置 2 min			
试剂三(μL)	100	100	100
酶标仪振板 5 s，室温避光孵育 10 min，酶标仪 640 nm 处测定各孔 OD 值。			

本试剂盒检测组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

组织和细胞样本中 ATP 酶酶活：

定义： 37°C 条件下，每克组织蛋白每分钟水解底物生成 1 μmol 产物所需要的 ATP 酶活定义为一个酶活力单位。

$$\text{ATPase 活力 (U/gprot)} = \frac{\Delta A - b}{a} \div C_{pr} \div T \times f \times 1000^*$$

注解：

y：标准品 OD 值-空白 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：样本测定 OD 值-样本对照 OD 值

T：孵育反应时间，30 min

C_{pr}：组织样本蛋白浓度：gprot/L

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

1000*：1 mmol/L = 1000 μmol/L

附录1 关键数据

1. 技术参数

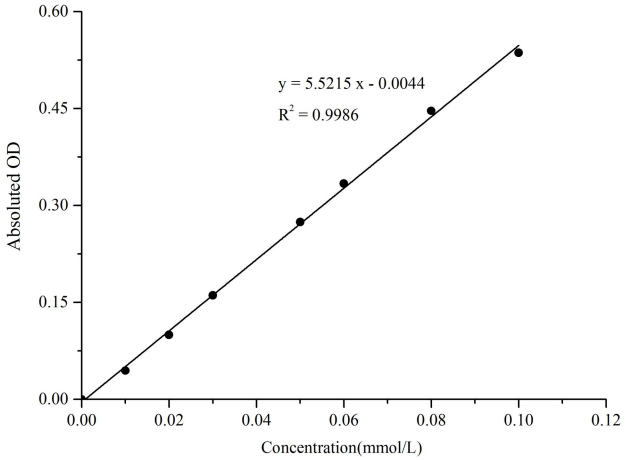
检测范围	0.06-2.75 U/L	**平均批间差**	5.0 %
灵敏度	0.06 U/L	**平均批内差**	4.0 %
平均回收率	95 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品加样量30 μL，按照操作步骤进行实验，各管OD值如下表所示：

标准品浓度 (mmol/L)	**0**	**0.01**	**0.02**	**0.03**	**0.05**	**0.06**	**0.08**	**0.1**
OD 值	0.048	0.091	0.148	0.208	0.323	0.383	0.491	0.590
	0.047	0.093	0.147	0.209	0.321	0.380	0.497	0.580
平均 OD 值	0.048	0.092	0.148	0.209	0.322	0.382	0.494	0.580
绝对 OD 值	0.000	0.045	0.100	0.161	0.275	0.334	0.447	0.540

②按上表数据绘制标准曲线，如下图所示：



附录2 实例分析

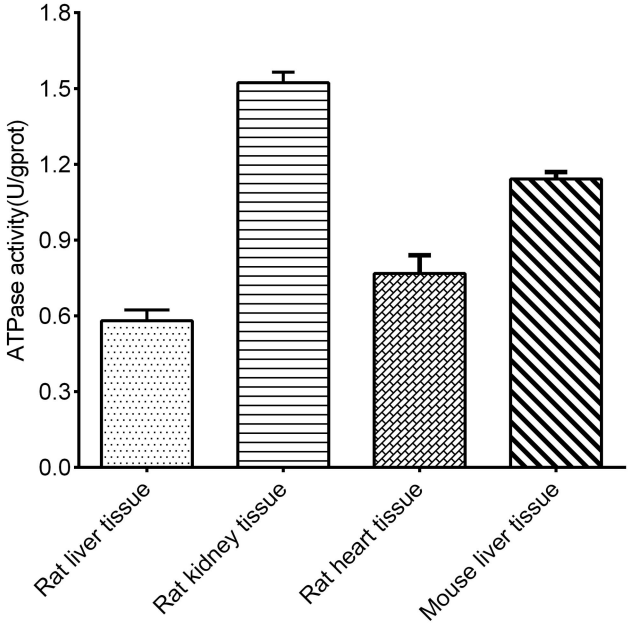
例如检测大鼠肝组织(数据仅供参考)：

取10%大鼠肝组织样本，稀释5倍，按操作表操作，结果如下：

标准曲线：y = 5.5215 x - 0.0044，样本对照孔平均OD值为0.639，样本测定孔平均OD值为0.784，10%大鼠肝脏组织匀浆蛋白浓度为7.75 gprot/L计算结果为：

$$\text{ATPase 活力 (U/gprot)} = \frac{(0.784 - 0.639) + 0.0044}{5.5215} \div 7.75 \div 30 \times 1000 \times 5 = 0.62\ \text{U/gprot}$$

按照说明书操作，测定大鼠肝组织(10%匀浆蛋白浓度为7.75 gprot/L，稀释5倍，加样量100 μL)、大鼠肾组织(10%匀浆蛋白浓度为6.85 gprot/L，稀释5倍，加样量100 μL)、大鼠心(10%匀浆蛋白浓度为4.80 gprot/L，稀释5倍，加样量100 μL)、小鼠肝组织(10%匀浆蛋白浓度为9.05 gprot/L，稀释5倍，加样量100 μL)中ATP酶活力(如下图)：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
测试结果偏低	样本稀释倍数较大	减小样本稀释倍数
	试剂二配制时间过长	现配现用，一周内使用完毕
复孔差较大	加显色剂工作液时产生气泡	缓慢加样，检测前吹打气泡
颜色干扰较大	有外部磷污染/干扰	使用容器清洗干净

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。

附录4 客户发表文献

1. Ouyang B , Zhong Q , Ouyang P ,et al.Graphene quantum dots enhance the biological nitrogen fixation by up-regulation of cellular metabolism and electron transport[J].Chemical Engineering Journal, 2024, 487.DOI:10.1016/j.cej.2024.150694.

2. Wang C , Zhao H , Liu Y ,et al.Neurotoxicity of manganese via ferroptosis induced by redox imbalance and iron overload[J].Ecotoxicology and Environmental Safety, 2024, 278(000):19.DOI:10.1016/j.ecoenv.2024.116404.

3. Li J , Zhang D , Zhang Y ,et al.Mitochondria‐specific antioxidant MitoTEMPO alleviates senescence of bone marrow mesenchymal stem cells in ovariectomized rats[J].Journal of Cellular Physiology, 2024, 239(8).DOI:10.1002/jcp.31323.

4. Chen X , Yang T , Zhou Y ,et al.Astragaloside IV combined with ligustrazine ameliorates abnormal mitochondrial dynamics via Drp1 SUMO/deSUMOylation in cerebral ischemia‐reperfusion injury[J].CNS Neuroscience & Therapeutics, 2024, 30(4).DOI:10.1111/cns.14725.

5. Gao X , Zhang R , Wang Z ,et al.Preliminary study on the protective effect of remazolam against sepsis-induced acute respiratory distress syndrome (ARDS)[J].PeerJ, 2024.