

ATP 检测试剂盒 (增强型)

A1508155

储存温度 -20°C 避光储存 (详细储存信息请见产品组份表)。

运输条件 冰袋运输, 收到后请及时放到储存条件下储存。

产品介绍

三磷酸腺苷 (ATP) 是细胞代谢的化学能量来源, 常被称作细胞的“能量货币”。ATP 在活细胞内通过光合作用与细胞呼吸过程生成, 并参与各类生命活动的能量消耗, 包括生物合成反应、细胞运动及细胞分裂等生理过程。ATP 是反映细胞活性的核心指标, 目前已广泛应用于科研与药物研发领域, 用于评估细胞活力及细胞毒性。通常细胞在凋亡、坏死或处于一些毒性状态下, ATP 水平会下降; 而高葡萄糖刺激等可上调某些细胞的细胞内 ATP 水平。

本试剂盒根据萤火虫萤光素酶(firefly luciferase, 也称荧光素酶)催化萤光素产生萤光时需要 ATP 提供能量研制而成。当萤火虫萤光素酶和萤光素都过量时, 在一定的浓度范围内萤光的产生和 ATP 的浓度成正比。这样就可以高灵敏地检测溶液中的 ATP 浓度。组份储存温度含-20°C 详细储存信息请见组份表 1。

产品组份

A1508155	组件	物理外观	100T	10×100T	储存	单次测试使用量
A1508155A	5×ATP 检测裂解液	无色透明液体	20 mL	10×20 mL	-20°C	按需
A1508155B	10×ATP 检测缓冲液	无色透明液体	10 mL	10×10 mL	-20°C	100 µL
A1508155C	D-荧光素	黄色液体	0.1 mL	10×0.1 mL	-20°C, 避光保存	按需
A1508155D	荧光素酶	无色透明液体	0.2 mL	10×0.2 mL	-20°C	按需
A1508155E	辅因子	无色透明液体	0.1 mL	10×0.1 mL	-20°C	按需
A1508155F	ATP 标准溶液 (500 µM)	无色透明液体	0.1 mL	10×0.1 mL	-20°C	按需

使用方法 (除非另有说明, 所有操作建议于 4℃ 下进行)

1. 额外所需材料:

自备试剂: PBS。

所需仪器: 多功能酶标仪 (具有检测化学发光检测仪功能)。

其它: 不透光的 96 孔白板或黑板、低温离心机、匀浆器 (组织样本)。

2. 溶液准备:

可使用试剂盒准备的缓冲液, 也可根据实际情况配制不同的缓冲液体系。所有缓冲液在使用前建议用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤, 缓冲液建议 4℃ 保存, 若试剂浑浊, 请立即丢弃。

- (1) 1×ATP 检测裂解液配制: 按照 4:1 的比例用去离子水将 5×ATP 检测裂解液稀释待用。
例如: 1 mL 5×ATP 检测裂解液加入 4 mL 去离子水, 混匀后即为 1×ATP 检测裂解液。
- (2) 辅因子: 即用型; 使用前将溶液分装为 10 份, 每份 10 μL , 置于 $\leq -20^\circ\text{C}$ 冻保存。已解冻的分装液需置于冰上或 4℃ 环境暂存, 直至使用。
- (3) 1×ATP 检测缓冲液配制: 按照 9:1 的比例用去离子水将 10×ATP 检测缓冲液稀释待用。
例如: 1 mL 10×ATP 检测液加入 9 mL 去离子水, 混匀后即为 1×ATP 检测缓冲液。
- (4) D-荧光素: 即用型。临用前分装为 10 份, 置于 $\leq -20^\circ\text{C}$ 避光冻保存, 直至使用。
- (5) ATP 检测工作液配制: 根据待测样品数参考下表配制适当量的 ATP 检测工作液, 表中试剂按比例混合后即为 ATP 检测工作液。ATP 检测工作液配制完成后, 若无法立即使用, 需置于避光条件下保存。

组份	1 个样品	10 个样品	100 个样品
1×ATP 检测缓冲液	96 μL	960 μL	9600 μL
D-荧光素	1 μL	10 μL	100 μL
荧光素酶	2 μL	20 μL	200 μL
辅因子	1 μL	10 μL	100 μL

注: 用不完的试剂分装后避光 -20℃ 保存, 避免反复冻融。

3. 样品准备 (注意: 样品裂解需在 4℃ 或冰上操作)

- (1) 对于**贴壁细胞**: 吸除培养液, 按照 6 孔板每孔加入 200 μL 1×ATP 检测裂解液的比例 (即相当于细胞培养液量 2 mL 的 1/10) 加入裂解液, 裂解细胞。裂解细胞时为了裂解充分, 可以使用移液器进行反复吹打或晃动培养板使裂解液充分接触并裂解细胞。通常细胞在接触裂解液后会立即裂解。裂解后 4℃ 12000×g 离心 5 分钟, 取上清, 用于后续的测定。
- (2) 对于**悬浮细胞**: 用离心管离心沉淀细胞, 弃上清, 轻轻弹散细胞, 按照 6 孔板每孔的细胞量加入 200 μL 1×ATP 检测裂解液, 裂解细胞。裂解细胞时为了裂解充分可以弹击

离心管管底或适当涡旋使裂解液充分接触并裂解细胞。通常细胞在接触裂解液后会立即裂解。裂解后 4℃ 12000×g 离心 5 分钟，取上清，用于后续的测定。

- (3) 对于**组织样品**：每 20 mg 组织加入约 100-200 μL 1×ATP 检测裂解液，用玻璃匀浆器或其它匀浆设备进行匀浆。充分匀浆以确保组织被完全裂解。裂解后 4℃ 12000×g 离心 5 分钟，取上清，用于后续的测定。

4. 标准曲线测定的准备

冰浴上融解待用试剂，把 ATP 标准溶液(500 μM)用 1×ATP 检测裂解液稀释成适当的浓度梯度。具体的浓度需根据样品中 ATP 的浓度而定。初次检测可以检测 0.01、0.03、0.1、0.3、1、3 和 10 μM 这几个浓度，在后续实验中，可以根据样品中 ATP 的浓度对标准品的浓度范围进行适当调整。

编号	裂解液体积 (μL)	ATP 标准溶液(500 μM)体积	最终浓度 (μM)
A	98	从 ATP 标准溶液 (0.5 mM) 中取 2 μL	10
B	70	从 A 管取 30 μL	3
C	90	从 A 管取 10 μL	1
D	90	从 B 管取 10 μL	0.3
E	90	从 C 管取 10 μL	0.1
F	90	从 D 管取 10 μL	0.03
G	90	从 E 管取 10 μL	0.01

5. ATP 浓度的测定

- 加 100 μL ATP 检测工作液到检测孔或检测管内；
- 在检测孔或检测管内加上 20 μL 样品或标准品，混匀，37℃ 孵育 15-20 分钟。待反应完成后，用多功能酶标仪测定 RLU。

注意：

- 样品的体积可以自行在 10-100 μL 范围内调节。如果样品中的 ATP 浓度比较低则可以加入 100 μL 样品，如果样品中 ATP 浓度比较高则可以加入较小体积的样品，同时标准品也需要使用相同的体积。如果样品中 ATP 的浓度特别高，可以用 ATP 检测裂解液稀释样品后再测定。本试剂盒在加入 10-100 μL 标准品时，在 0.1nM-10 μM 的浓度范围内有很好的线性关系。
- 对于高浓度 ATP 样品，可适当延长孵育时间 (不超过 30 分钟)，确保反应进入稳定平台期后再读数，以获得最佳线性相关性；对于低浓度 ATP 样品，在标准孵育条件下信号上升较快，通常在 3-5 分钟即可达到可检测的稳定信号，可提前读数以提高实验效率。
- 根据标准曲线计算出样品中 ATP 的浓度。

注意事项

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，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
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. ATP 检测试剂中含有萤光素酶，反复冻融会导致其逐渐失活。为取得良好的使用效果，第一次解冻后可适当分装保存，但需注意分装的容器不能 ATP 污染。ATP 检测试剂稀释成 ATP 检测工作液后，最好一次用完，不宜冻存后再使用。
5. ATP，特别是裂解后样品中的 ATP 在室温不太稳定，需在 4°C 或冰上操作。
6. 本试剂盒需使用 luminometer，即化学发光仪(检测萤光素酶报告基因时所用的仪器)。如果没有 luminometer，也可以使用液闪仪。液闪仪的测定效果取决于液闪仪的检测灵敏度和检测精度。
7. 使用可检测化学发光的多功能酶标仪时，推荐使用孔和孔之间不透光的 96 孔白板或黑板。如使用普通的透明 96 孔板，须特别注意在检测孔之间设置间隔孔，以减少邻近孔之间的相互干扰。
8. 每次实验均需同步运行标准品。工作液的荧光本底值会随时间逐渐升高，进而降低检测灵敏度。
9. 由于荧光素-萤光素酶反应灵敏度极高，需避免外源生物源 ATP 污染，例如细菌、指纹等带来的污染。建议使用的超纯水、枪头、离心管、耗材无 ATP 污染。
10. 荧光素、发光反应液对光敏感，光照会加速试剂失活、背景升高，建议实验操作时全程避光。
11. 含萤火虫萤光素酶的溶液请轻柔混匀(如颠倒混匀)，禁止涡旋振荡，以防酶蛋白变性。
12. 磷酸盐类化合物会抑制本反应体系。此外，样品中的高盐浓度通常会对萤光素酶产生抑制效应，并降低灵敏度。