



## ADP/ATP发光检测试剂盒

### (ADP/ATP-Lite Assay Kit)

#### 产品说明:

ATP参与多种酶促反应，维持正常的生命活动。多种激酶和ATP酶可将ATP转化成ADP。通过ATP和ADP的检测，可以观察这些酶促反应的进程。同时，ADP和ATP含量的变化，也与细胞的活性状态有密切关系；正常细胞发生凋亡及坏死时，ADP和ATP的含量，均有特征性的改变。本试剂盒采用生物发光(bioluminescent)法，依据荧光素酶(luciferase)催化底物荧光素的转化，高效利用ATP的能量，发射出光子。萤火虫荧光素酶(Firefly luciferase)催化的发光反应，与ATP浓度具有很好的线性依赖关系和极高的敏感性，ATP的检测灵敏度达到 $10^{-13}$  mol。本试剂盒首先利用荧光素酶反应体系，测定样品中ATP的发光值，然后用ADP转换酶将ADP转化成ATP，再次利用同样的发光体系，测定样品中ADP转化所得的发光值。获得的结果可提供样品中ADP和ATP的相对含量及变化，从而了解酶促反应的进程或细胞状态的改变。

#### 产品内容与储存方法:

名称	数量	保存条件
100x Lysis Buffer (细胞裂解液)	1 ml	-20°C
ADP/ATP Assay Buffer (反应缓冲液)	10 ml	-20°C
Luciferin	0.5 ml	-20°C
Firefly luciferase	1 ml	-20°C
ATP Converting Enzyme	1 ml	-20°C

可作200次以上ADP/ATP检测。低温运输，-20°C或-80°C避光保存。有效期6个月。

#### 所需其它试剂:

使用者需准备PBS、双蒸水等。

#### 操作方法:

##### 样品准备:

对体外酶促反应样品，一般可直接用双蒸水稀释后进行检测。样品中ATP含量应稀释到0.1 mM一下，以保证在测定的线性范围内。

对于培养细胞，按下列方法进行：

- 1) 配制裂解液：临用前，取适量100x Lysis Buffer，用双蒸水稀释至1xLB，混匀。1xLB可长期冻存于-20°C。
- 2) 细胞清洗收集：倾去培养板/皿中的培养液，加入足量PBS，轻轻洗涤细胞。完全倾去洗涤液，胰酶消化后计数。如为悬浮细胞或部分悬浮细胞，应离心收集计数。细胞重悬于少量PBS中。
- 3) 细胞裂解：将一定数量的细胞悬液（如5000~50000个细胞）移入1.5 ml离心管，加入200~500  $\mu$ l裂解液在涡旋振荡器上充分混悬震荡30秒，注意保持各样品的细胞浓度基本一致。裂解细胞可直接用于发光测定，也可离心30秒，取上清做发光测定

。裂解细胞含量较多时，可将样品用双蒸水稀释，以保证在测定ATP的线性范围内。

*配制发光反应液：*

测定前，在室温待ADP/ATP Assay Buffer和Luciferin溶化，混匀（注意避光）。按20/1比例用ATP assay Buffer稀释Luciferin，再加入1/10体积的Luciferase，配制所需体积的Assay Reagent（注意避光），置冰上待用。取适量ATP Converting Enzyme用等体积Assay Reagent稀释混匀，置冰上待用。

*测定仪器的设置：*

按仪器操作说明开启发光测定仪。手动操作型仪器，将测读时间设为。自动操作型仪器，一般将测定延迟设为2秒，将测读时间设为10-20秒，

*手动发光测定：*

取待测样品5 μl加入测量管底部，取Assay Reagent 50 μl加入管底部，轻轻敲击管壁3~5次混匀，放入仪器中立即测定，测读时间设为10-20秒，记录发光值为ATP的发光单位(RLU)，和CPM值(A值)。如用多孔板同时手动测定多个样品，则将各待测样品5 μl分别加入连续的各孔底部，用多道加样器于各孔底加入Assay Reagent 50 μl，轻轻敲击板侧3~5次混匀，放入仪器中立即测定，测读时间设为10-20秒，记录发光值为ATP的发光单位(RLU)，和CPM值(A值)。10 min后，重复测定，测读时间设为60秒，记录发光值为ATP的残余发光单位(RLU)，即CPM值(B值)。各管/板孔底部再加入稀释的ATP Converting Enzyme 10 μl，等10 min后，重复测定，测读时间设为60秒，记录发光值为ADP转化的发光单位(RLU)，即CPM值(C值)。

*自动发光测定：*

配制好的Assay Reagent和稀释的ATP Converting Enzyme均置于测定仪内，并分别连接好对应管道。Assay Reagent的注入体积设定为50 μl，设定立即测读10-20秒和10 min后测定60秒；ATP Converting Enzyme的注入时间设定在以上测读后，体积设定为10 μl，设定10 min后测读60秒。各待测样品5 μl分别加入测定，启动自动测量程序。记录ATP的发光CPM值(A值)、ATP的残余发光CPM值(B值)和ADP转化的发光CPM值(C值)。

*结果计算：*

样品中ADP与ATP的相对比值可按公式计算： $ADP/ATP=(C-B \times 2)/A$

对于细胞样品，通常，坏死细胞比凋亡细胞ADP/ATP有更显著的增高。

**注意事项：**

- 1) Assay Buffer, Luciferin、Luciferase和ATP Converting Enzyme应避免反复冻融，可分装成合适体积分次使用。配制好的Assay Reagent不能长期保存。
- 2) Luciferase活性可被多种化学物质如一些去污剂抑制，设计和分析实验结果时，应考虑到这个因素。
- 3) 测定样品量可设定为2~20 μl；Assay Reagent加入量也可增加至100 μl。但应保持整个实验的一致性。
- 4) 用多孔板同时手动测定多个样品时，要尽量缩短样品间试剂加入的时间间隔。
- 5) ATP检测的灵敏度与样品处理方法、发光测定仪的灵敏度等均有关系。可先进行一个简单的预实验以确定设计实验的灵敏度和ATP检测的线性范围。