

EK-Bioscience

Biotechnology Co., Ltd. Shanghai enzyme research

This kit is for in vitro research use, not for clinical diagnosis!

(本试剂盒仅供体外研究使用, 不用于临床诊断!)

人三磷酸腺苷 (ATP) 酶联免疫分析试剂盒

Human (ATP) ELISA Kit

CAS. NO:EK-H12426

声明: 尊敬的客户, 感谢您选用本公司的产品。本试剂盒用于测定人血清、血浆及相关液体样本中三磷酸腺苷 (ATP) 含量。使用前请仔细阅读说明书并检查试剂组分! 如有疑问, 请及时联系我们。

试剂盒组成:

中文名称	English name	96T/48T 含量	保存
ELISA 酶标板(可拆卸)	Microelisa stripplate	8×12 / 8×6 *	2-8℃
标准品(8000nmol/L)	Standard	1 瓶 0.5ml *	2-8℃
标准品稀释液	Standard diluent	1 瓶 1.5ml *	2-8℃
酶标试剂	HRP-Conjugate reagent	1 瓶 6 ml/3ml *	2-8℃
样品稀释液	Sample diluent	1 瓶 6 ml/3ml *	2-8℃
显色剂 A 液	Chromogen Solution A	1 瓶 6 ml/3ml *	2-8℃
显色剂 B 液	Chromogen Solution B	1 瓶 6 ml/3ml *	2-8℃
终止液	Stop Solution	1 瓶 6 ml/3ml *	2-8℃
浓缩洗涤液	wash solution	1 瓶 20ml *	2-8℃
说明书	Instruction	1 份 *	
封板膜	Closure plate membrane	2 片 *	
密封袋	Sealed bags	1 个 *	

实验原理

本试剂盒应用双抗体夹心法测定标本中人三磷酸腺苷 (ATP) 水平。用纯化的人三磷酸腺苷 (ATP) 抗体包被微孔板, 制成固相抗体, 往包被单抗的微孔中依次加入三磷酸腺苷 (ATP), 再与 HRP 标记的三磷酸腺苷 (ATP) 抗体结合, 形成抗体-抗原-酶标抗体复合物, 经过彻底洗涤后加底物 TMB 显色。TMB 在 HRP 酶的催化下转化成蓝色, 并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的三磷酸腺苷 (ATP) 呈正相关。用酶标仪在

450nm 波长下测定吸光度 (OD 值), 通过标准曲线计算样品中人三磷酸腺苷 (ATP) 浓度。

标本要求

1. **血清:** 室温血液自然凝固 10-20 分钟后, 离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清。保存过程中如有沉淀形成, 应再次离心。
2. **血浆:** 应根据标本的要求选择 EDTA、柠檬酸钠或肝素作为抗凝剂, 混合 10-20 分钟后, 离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分) 仔细收集上清。保存过程中如有沉淀形成应再次离心。
3. **尿液:** 用无菌管收集。离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清。保存过程中如有沉淀形成, 应再次离心。胸腹水、脑脊液参照此实行。
4. **细胞培养上清:** 检测分泌性的成份时, 用无菌管收集。离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清。
5. **培养细胞:** 检测细胞内的成份时, 用 PBS (PH7.2-7.4) 稀释细胞悬液, 细胞浓度达到 100 万/ml 左右。通过反复冻融或加入组织蛋白萃取试剂, 以使细胞破坏并放出细胞内成份。离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分) 仔细收集上清。保存过程中如有沉淀形成, 应再次离心。
6. **组织标本:** 切割标本后, 称取重量。加入一定量的 PBS, PH7.4。用液氮迅速冷冻保存备用。标本融化后仍然保持 2-8℃ 的温度。加入一定量的 PBS (PH7.4), 或组织蛋白萃取试剂, 用手工或匀浆器将标本匀浆化。离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清。分装后一份待检测, 其余冷冻备用。
7. 标本采集后尽早进行提取, 提取按相关文献进行, 提取后应尽快进行实验。若不能马上进行试验, 可将标本放于 -20℃ 保存, 但应避免反复冻融
8. 不能检测含 NaN₃ 的样品, 因 NaN₃ 抑制辣根过氧化物酶的 (HRP) 活性。

试验所需自备物品:

1. 酶标仪(450nm 波长滤光片)
2. 高精度移液器, EP 管及一次性吸头
3. 37℃ 恒温箱, 双蒸水或去离子水
4. 吸水纸

操作步骤

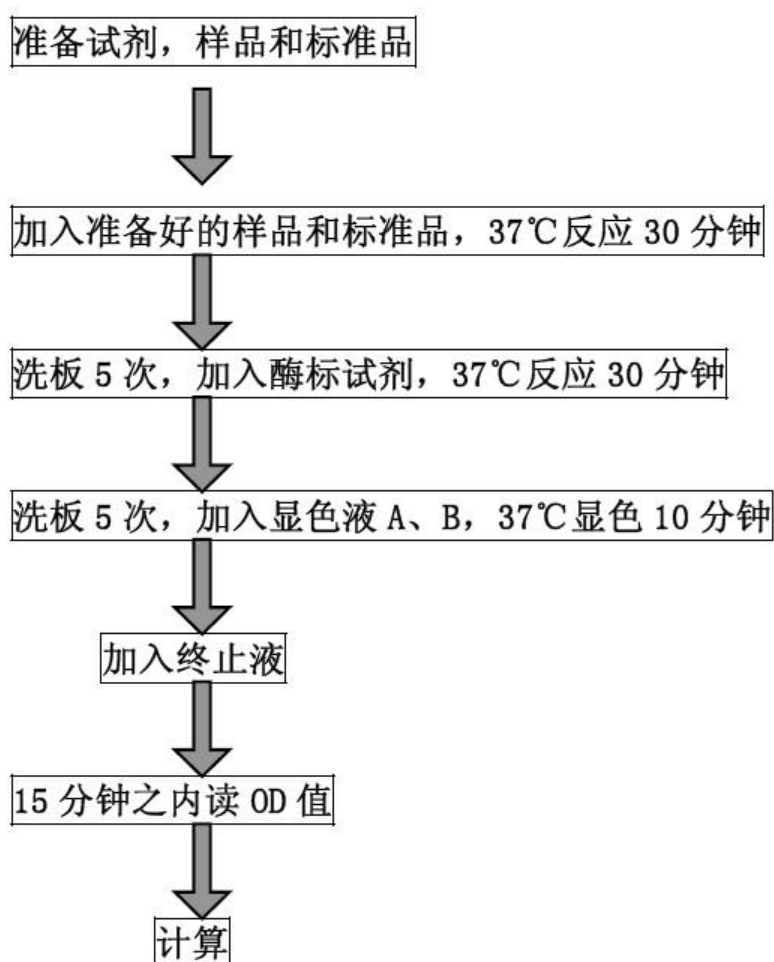
1. 标准品的稀释: 本试剂盒提供原倍标准品一支, 用户可按照下列图表在小试管中进行稀释。

4000nmol/L	5 号标准品	150μl 的原倍标准品加入 150μl 标准品稀释液
2000nmol/L	4 号标准品	150μl 的 5 号标准品加入 150μl 标准品稀释液
1000nmol/L	3 号标准品	150μl 的 4 号标准品加入 150μl 标准品稀释液
500nmol/L	2 号标准品	150μl 的 3 号标准品加入 150μl 标准品稀释液
250nmol/L	1 号标准品	150μl 的 2 号标准品加入 150μl 标准品稀释液

2. 加样: 分别设空白孔 (空白对照孔不加样品及酶标试剂, 其余各步操作相同)、标准孔、待测样品孔。在酶标包被板上标准品准确加样 50μl, 待测样品孔中先加样品稀释液 40μl, 然后再加待测样品 10μl (样品最终稀释度为 5 倍)。加样将样品加于酶标板孔底部, 尽量不触及孔壁, 轻轻晃动混匀。
3. 温育: 用封板膜封板后置 37℃ 温育 30 分钟。
4. 配液: 将 30 倍 (48T 的 20 倍) 浓缩洗涤液用蒸馏水 30 倍稀释后备用

5. 洗涤：小心揭掉封板膜，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液，静置 30 秒后弃去，如此重复 5 次，拍干。
6. 加酶：每孔加入酶标试剂 50 μ l，空白孔除外。
7. 温育：用封板膜封板后置 37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟。
8. 洗涤：小心揭掉封板膜，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液，静置 30 秒后弃去，如此重复 5 次，拍干。
9. 显色：每孔先加入显色剂 A50 μ l，再加入显色剂 B50 μ l，轻轻震荡混匀，37 $^{\circ}$ C 避光显色 10 分钟。
10. 终止：每孔加终止液 50 μ l，终止反应（此时蓝色立转黄色）。
11. 测定：以空白空调零，450nm 波长依序测量各孔的吸光度（OD 值）。测定应在加终止液后 15 分钟以内进行。

操作程序总结：



计算

以标准物的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，在坐标纸上绘出标准曲线，根据样品的 OD 值由标准曲线查出相应的浓度；再乘以稀释倍数；或用标准物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程式，将样品的 OD 值代入方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。

注意事项

1. 试剂盒从冷藏环境中取出应在室温平衡 15-30 分钟后方可使用，酶标包被板开封后如未用完，板条应装入密封袋中保存。
2. 浓洗涤液可能会有结晶析出，稀释时可在水浴中加温助溶，洗涤时不影响结果。
3. 各步加样均应使用加样器，并经常校对其准确性，以避免试验误差。一次加样时间最好控制在 5 分钟内，如标本数量多，推荐使用排枪加样。
4. 请每次测定的同时做标准曲线，最好做复孔。如标本中待测物质含量过高（样本 OD 值大于标准品孔第一孔的 OD 值），请先用样品稀释液稀释一定倍数（n 倍）后再测定，计算时请最后乘以总稀释倍数（ $\times n \times 5$ ）。
5. 封板膜只限一次性使用，以避免交叉污染。
6. 底物请避光保存。
7. 严格按照说明书的操作进行，试验结果判定必须以酶标仪读数为准。
8. 所有样品，洗涤液和各种废弃物都应按传物处理。
9. 本试剂不同批号组分不得混用。

实验目的、灵敏度、检测范围和重复性:

- 实验目的：测定人血清、血浆及相关液体样本中三磷酸腺苷（ATP）含量。
- 灵敏度：最小可测 90nmol/L。
- 检测范围 150nmol/L - 4000nmol/L。
- 重复性：板内，板间变异系数均<10%。

问题分析

若实验效果不好，请及时对显色结果拍照，保留所用板条及未使用试剂，并妥善保存，然后联系我公司技术支持为您解决问题。同时您也可以参考以下资料：

问题描述	可能原因	相应对策
标准曲线梯度差	吸液或加液不准	检查移液器及吸头
	标准品稀释不正确	溶解标准品稍微旋转瓶身，轻轻混匀使粉末完全溶解
	洗涤不完全	保证洗涤时间和洗涤次数及每孔的加液量
显色很弱或无色	孵育时间太短	保证充足的孵育时间
	实验温度不正确	使用推荐的实验温度
	试剂体积不够或漏加	检查吸液及加液过程，保证所有试剂按顺序足量添加
	稀释不正确	
读数数值低	酶标仪设置不正确	在酶标仪上检查波长及滤光片设置
		提前打开酶标仪预热
变异系数大	加液不正确	检查加液情况
背景值高	检测抗体的工作浓度	使用推荐的稀释倍数
	酶标板洗涤不完全	重新阅读操作手册，保证清洗完全；如果用自动洗板机，请检查所有的出口是否有堵塞
	洗液有污染	配制新鲜的洗液
灵敏度低	ELISA 试剂盒保存	按说明书要求保存相关试剂
	读数前未终止	OD 读数前应在每孔中加入终止液

声明

1. 限于现有条件及科学技术水平，尚不能对所有原料进行全面的鉴定分析，本产品可能存在一定的质量技术风险。
2. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及当时的实验环境密切相关，请务必准备充足的待测样品。
3. 只有全部使用试剂盒内的试剂才能保证检测效果，不能混用其他制造商的产品。只有严格遵守本实验说明才会得到最佳的检测结果。
4. 有效期：6 个月。

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：

销售部电话	TEL	021-61840799
电子邮箱（销售）	E-mail(sale)	shmysw06@163.com
电子邮箱（技术）	E-mail(technician)	shmysw08@163.com
QQ 客服	QQ customer service	2712765620
网址	http://	www.elisakits.cn

联系时请提供产品货号，以便我们更高效地为您服务。 谢谢！

This kit is for in vitro research use, not for clinical diagnosis!