

EZ-ATP Assay Kit

Metabolism Assay Kit

Cat. No. DG-ATP100

FOR RESEARCH USE ONLY.

NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

▪ Product Description

ATP는 살아있는 생명체의 중요한 에너지입니다. 에너지를 필요로 하는 모든 과정은 ATP의 인산 결합에 저장된 화학 에너지를 이용합니다. ATP는 미토콘드리아에서만 형성되며 다양한 유전 질환이 ATP 형성에 영향을 줍니다. Femtomoles 또는 그 이하 농도의 ATP를 luminescence를 이용하여 검출하는 상업적으로 이용 가능한 많은 ATP 분석법이 있지만 이들은 전문화된 기기가 필요하고 매우 활성이 불안정한 Luciferase를 이용합니다.

DoGENBio의 EZ-ATP Assay Kit는 Glycerol의 인산화 반응을 유도하여, ATP의 농도에 비례하여 생성되는 Glycerol-6-phosphate를 흡광($OD_{570\text{ nm}}$) 또는 형광($Ex/Em = 535/595\text{ nm}$) 방법으로 검출함으로써 간접적으로 ATP의 농도를 측정할 수 있는 제품입니다.

▪ Kit Contents and Storage Conditions

Component	100 assay	Cap Cord	Storage (reconstituted)
ATP Assay buffer	25mℓ	-	-20 °C, 2개월
ATP Enzyme mix (Lyophilized)	1 vial	Red	-20 °C, 2개월
ATP converter	200μℓ	Blue	-20 °C, 2개월
ATP Probe	200μℓ	Yellow	-20 °C, 2개월
ATP Standard (10mM)	100μℓ	Green	-20 °C, 2개월

* 본 제품은 연구 목적으로만 사용되어야 하며, 인체용 또는 진단을 목적으로 사용되어서는 안됩니다.

* 본 제품으로 수행할 수 있는 test 수에 있어서 100 assays라 함은 96 well plate 1 well을 기준으로 100개의 well을 처리할 수 있는 시약을 제공한다는 의미입니다. 이 중 standard, blank, sample당 duplication 처리 등을 고려하면 실제 테스트 가능한 시료의 숫자는 20~40 samples의 범위에 있습니다. 제품설명서를 자세히 검토하고, 테스트하고자 하는 sample의 특성을 고려하여 소요되는 키트의 수를 결정하십시오.

▪ Preparation of Reagent

Solution	Preparation	Storage and Stability
ATP Enzyme mix	220 μl Assay Buffer 을 넣고 pipette을 이용하여 잘 혼합해 줍니다.	혼합한 용액은 -20°C에서 2개월 동안 안정합니다.
ATP Probe	상온에서 충분히 녹인 후 사용합니다.	-20°C에서 2개월 동안 안정합니다.

* Assay buffer는 실험 전 상온에서 충분히 warming up 한 후 사용하십시오.

* 차가운 상태의 buffer를 사용시 enzyme 활성이 억제되어 측정결과에 영향을 줄 수 있습니다.

▪ General Protocol

1. Standard preparation

1) Colorimetric method : ATP standard solution (10 mM) 10 μl 와 distilled water 90 μl 를 섞어 1 mM standard solution을 준비합니다.

96 well plate에 0, 2, 4, 6, 8, 10 μl 를 분주하고 assay buffer로 최종 volume을 50 μl 로 조정하면 각 plate에 0, 2, 4, 6, 8, 10 nmol/well의 standard set가 마련됩니다.

Standard No.	Volume of 1mM ATP standard	Assay buffer	Final standard volume in well	Final standard amount in well (nmol/well)
1	0 μl	50 μl	50 μl	0
2	2 μl	48 μl	50 μl	2
3	4 μl	46 μl	50 μl	4
4	6 μl	44 μl	50 μl	6
5	8 μl	42 μl	50 μl	8
6	10 μl	40 μl	50 μl	10

* 정확한 측정을 위해 standard 및 sample은 각각 two replicates 이상으로 준비하여 실험하시는 것을 권장합니다.

* Standard는 실험 시 마다 측정하는 것을 권장합니다.

2) Fluorometric method : Colorimetric assay보다 약 10-100 배 정도 감도가 높으므로 distilled water를 이용하여 standard solution을 0.01-0.1 mM이 되도록 희석하고 colorimetric method와 같은 방법으로 standard set을 준비합니다.

2. Sample preparation

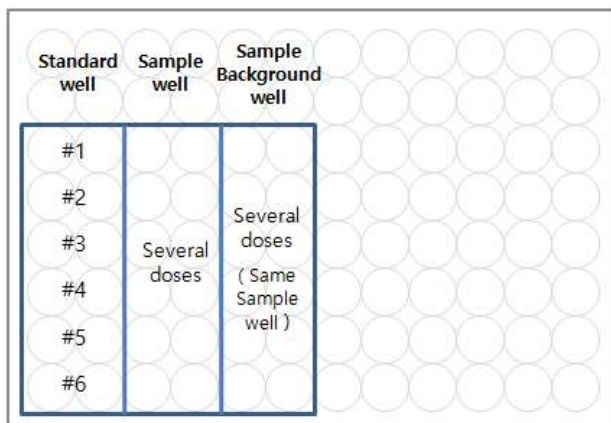
준비된 sample을 96 well plate에 2-50 μl 넣은 후, 최종 volume은 assay buffer로 50 μl

가 되도록 조정합니다. ($n \geq 2$)

- 1) 1×10^6 cells 또는 10 mg tissue sample에 ATP assay buffer 100 μl 를 넣어 용해 (lysis)시키거나 균질화 (homogenize) 합니다. Cell lysate, tissue homogenate는 10 KD spin column등을 이용하여 제단백 (deproteinization) 과정을 거쳐 사용하십시오.
- 2) ATP는 불안정하므로 Sample은 fresh하게 준비하여 사용합니다. 여러 sample을 순차적으로 준비해야 하는 경우 deproteinization 과정을 거쳐 액체질소 또는 드라이아이스를 이용하여 sample을 신속히 얼려야 합니다.
- 3) Tissue sample은 ATP를 빠르게 분해하는 효소를 포함할 수 있으므로 sample의 신속한 처리와 deproteinization을 권장합니다.
- 4) 미지의 시료 또는 처음 측정하는 시료의 경우 측정 값이 standard curve 내에 위치하도록 예비실험을 거친 후 사용을 권장합니다.
- 5) Endogenous 화합물들은 반응을 방해할 수 있으므로 ATP를 정확하게 측정하려면 standard (300 pmol)를 sample에 넣어 spike 측정을 권장합니다.

3. Sample Background preparation

Sample 내에 존재하는 Glycerol phosphate가 background를 증가시킬 수 있습니다. 2번에서 준비된 sample과 같은 방식으로 sample Background를 준비합니다. ($n \geq 2$)



Example arrangement on a 96well plate

4. Reaction mixture preparation

1 assay 기준의 volume이며, 실험에 사용하려는 assay양을 계산하여 여유 있게 reaction mix를 준비합니다.

1) Colorimetric method:

Components	Reaction mixture	Background Reaction mixture
ATP assay buffer	44 μ l	46 μ l
ATP Enzyme mix	2 μ l	2 μ l
ATP converter	2 μ l	-
ATP Probe	2 μ l	2 μ l
ToTal	50 μ l	50 μ l

2) Fluorometric method:

Components	Reaction mixture	Background Reaction mixture
ATP assay buffer	45.8 μ l	47.8 μ l
ATP Enzyme mix	2 μ l	2 μ l
ATP converter	2 μ l	-
ATP Probe	0.2 μ l	0.2 μ l
ToTal	50 μ l	50 μ l

* Reaction mix에서 Converter를 제하는 경우 샘플에 포함된 glycerol phosphate만 검출되고 ATP로 인해 새로 생성된 Glycerol phosphate는 검출되지 않기 때문에 본래 Sample 내에 존재하는 Glycerol phosphate 양을(Background) 측정할 수 있게 됩니다.

5. Reaction mixture를 ATP standard와 실험물질이 준비된 각 well에 Multi pipette을 이용하여 50 μ l씩 넣어준 후, 잘 섞어줍니다.

6. Background Reaction mixture를 Sample Background well에 Multi pipette을 이용하여 50 μ l씩 넣어준 후, 잘 섞어줍니다.

7. Plate를 빛이 차단된 상온에서 30분간 반응시킨 후, 부드럽게 shaking 하여 microplate reader로 측정합니다.

1) Colorimetric : 570 nm

2) Fluorometric : (Excitation/Emission): 535 nm / 595 nm

▪ Calculation

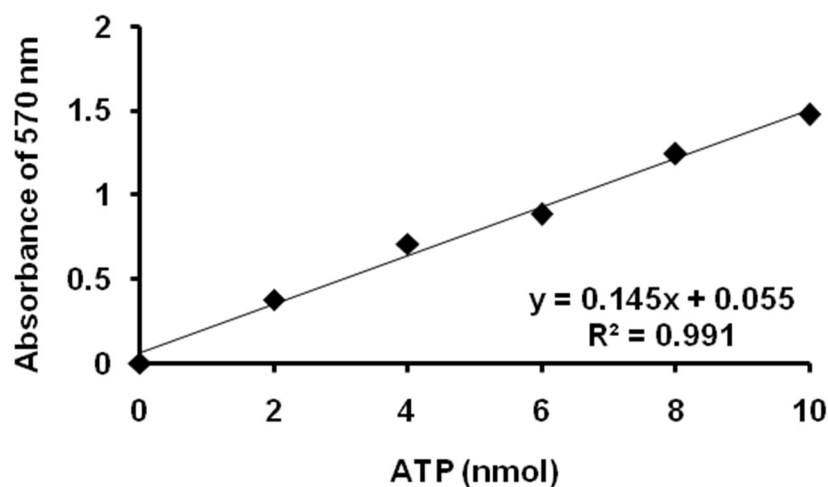
1. 각 standard well과 sample well, sample Background well 의 duplicate 측정값을 평균합니다.
2. 모든 측정 값에서 standard 1 값을 (blank) 빼줍니다.
* Blank = OD_{570nm} from ATP standard #1 (0 nmol ATP)
3. ATP standard 측정값을 이용하여 standard curve를 그려줍니다.
(ATP standard concentration Vs 측정값)
4. Sample 측정값에서 sample Background 측정값을 빼줍니다.
5. Standard curve 에 sample 측정값 수치를 대입하여 sample내의 ATP 양을 계산하여 줍니다.
6. 5에서 계산된 sample 내의 ATP 양과 실험 well에 넣어준 sample의 양을 이용하여 ATP농도를 계산하여 줍니다.

$$\text{샘플 내 ATP농도 (C)} = B/V \times D \text{ (nmol/}\mu\text{l or mM)}$$

B: 측정 well의 ATP 양(nmol)

V: well에 분주한 시료의 양(μl)

D: 샘플 희석 배율(2배 희석한 경우 x 1/2 이 아닌 x2로 계산합니다.)



ATP standard curve. Assay was performed following the kit protocol.

※ Spike sample: 샘플 내의 어떤 성분이 반응에 영향을 주었을 가능성이 있는 경우, 예를 들

어 ATP가이 실제로는 4 nmol이 있지만 어떤 물질의 영향으로 인해 3.2 nmol (80%)만 존재하는 것으로 결과값이 나타나는 경우가 있습니다. 이러한 현상을 보정하기 위해 샘플과 별도로 샘플에 일정량의 standard를 첨가한 well을 따로 설정하여 그 결과 값을 통해 실제 샘플의 농도를 보정하는 방법입니다.

이 실험에서 spike sample을 이용한 경우 위 농도 계산식은 다음과 같이 정리됩니다.

$$\text{샘플 내 ATP 의 양(B)} = \text{OD1} / (\text{OD2} - \text{OD3}) * \text{ATP spike (pmol)}$$

OD1 : Sample 의 OD값 (blank corrected)

OD2 : Spiked sample의 OD값 (blank corrected)

OD3 : Sample의 OD값 (blank corrected)

ATP spike: 샘플에 넣은 ATP spike의 양

※ ATP 분자량: 507.18 g/mol

▪ Related Product

	Products	Catalog No.	Assay
Oxidative Stress Assay Kit	EZ-Superoxide Dismutase (SOD) Assay Kit (Colorimetric)	DG-SOD400	400 Assay
	EZ-Glutathione Assay Kit (Colorimetric)	DG-GLU200	200 Assay
	EZ-Catalase Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-CAT400	400 Assay
	EZ-Hydrogen peroxide/Peroxidase Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-PER500	500 Assay
	EZ-Lipid Peroxidation (TBARS) Assay Kit (Colorimetric)	DG-TBA200	200 Assay
	EZ-Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay Kit (Colorimetric)	DG-TAC200	200 Assay
	EZ-DPPH Antioxidant Assay Kit (Colorimetric)	DG-DPH400	400 Assay
	EZ-ABTS Antioxidant Assay Kit (Colorimetric)	DG-ABT400	400 Assay
	EZ-Glutathione Peroxidase Assay Kit (Colorimetric)	DG-GPX100	100 Assay
Metabolism Assay Kit	EZ-Lactate Assay Kit (Colorimetric)	DG-LAC100	100 Assay
	EZ-Acetylcholinesterase Assay Kit (Colorimetric)	DG-ACE100	100 Assay
	EZ-Ascorbic Acid Assay Kit (Colorimetric)	DG-ASC100	100 Assay
	EZ-ATP Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-ATP100	100 Assay
	EZ-Free Fatty Acid Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-FFA100	100 Assay
	EZ-Free Glycerol Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-FGC100	100 Assay
	EZ-Glucose Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-GCS100	100 Assay
	EZ-HDL, LDL/VLDL Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-CHO100	100 Assay
	EZ-Total Cholesterol Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-TSC100	100 Assay
	EZ-Triglyceride Quantification Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-TGC100	100 Assay
	EZ-Nitric Oxide Assay kit (Colorimetric)	DG-NO500	500 Assay
	EZ-Total Collagen Assay Kit (Colorimetric)	DG-COL100	100 Assay
	EZ-Ethanol Assay Kit (Colorimetric)	DG-ETH100	100 Assay

