

ATP 含量试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

注 意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

ATP 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，是生物能量通货，能荷是描述细胞能量代谢状态的主要参数。测定 ATP 含量并且计算能荷，能够反映能量代谢状态。

测定原理：

肌酸激酶催化肌酸和 ATP 反应生成磷酸肌酸，可在 700nm 下用磷钼酸比色法检测磷酸肌酸含量，以此反应 ATP 含量。

自备仪器和用品：

分光光度计/酶标仪、水浴锅、可调式移液枪、微量石英比色皿/96 孔板、研钵和蒸馏水。

试剂组成和配制：

酸性提取液：液体 60mL×1 瓶，4℃ 保存；

碱性提取液：液体 60mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：粉剂×1 支，4℃ 保存；临用前加入 1mL 蒸馏水充分溶解待用；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融。

试剂二：液体 1.5mL×1 支，4℃ 保存；

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃ 保存；临用前加入 500 μ L 蒸馏水充分溶解待用；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融。

试剂四：液体 5mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂五：液体 25mL×1 瓶，4℃ 保存；

标准液：液体 10mL×1 瓶，2 μ mol/mL ATP 标准液，4℃ 保存；

ATP 提取：

1、血清（浆）中 ATP 的提取：按照血清（浆）体积（mL）：酸性提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议取约 0.1mL 血清（浆），加入 1mL 酸性提取液），进行冰浴匀浆，8000g 4℃ 离心 10min；取上清液至另一 EP 管中，加入等体积的碱性提取液使之中和，混匀，8000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测（不可用于蛋白质含量测定）。

2、组织中 ATP 的提取：按照组织质量（g）：酸性提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 酸性提取液），进行冰浴匀浆，8000g 4℃ 离心 10min，取上清至另一 EP 管中，加入等体积的碱性提取液使之中和，混匀，8000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测（不可用于蛋白质含量测定）。

3、细胞或细菌中 ATP 的提取：先收集细胞或细菌到离心管内，弃上清，按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：酸性提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 酸性提取液），超声波破碎 1min（冰浴，强度 20% 或 200W，超声 2s，停 1s），8000g 4℃ 离心 10min；取上清液至另一 EP 管中，加入等体积的碱性提取液使之中和，混匀，8000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测（不可用于蛋白质含量测定）。

测定步骤:

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长到 700nm，蒸馏水调零。
- 2、显色剂的配制：临用前请根据拟用显色剂体积（样本数×0.2 mL），按试剂四(mL): 试剂五 (mL)=1: 5 的比例配制。用多少配多少。

3、样本测定:

试剂名称(μL)	测定管	对照管	标准管	空白管
样本	10	10		
标准液			10	10
试剂一	20		20	
试剂二	10	10	10	10
试剂三	10		10	
蒸馏水		30		30

充分混匀，37℃准确水浴 30min

显色剂	200	200	200	200
-----	-----	-----	-----	-----

37℃水浴 20min 后，700nm 下测定各管吸光值

注意：空白管和标准管通常只需要各做一个。每个测定管设一个对照管。

ATP 含量计算:

1、血清（浆）中 ATP 含量计算

ATP 含量(μmol/mL)=[C 标准管×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管)×V1]÷(V3×V1÷V2)=40×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管)

2、组织、细菌或细胞中 ATP 含量计算

(1) 按蛋白浓度计算

ATP 含量(μmol/mg prot)=[C 标准管×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管)×V1]÷(V1÷Cpr) =2×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管)÷Cpr

蛋白质含量需要另外测定。

(2) 按样本鲜重计算

ATP 含量(μmol/g 鲜重)=[C 标准管×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管)×V1]÷(W×V1÷V2)=4×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管)÷W

(3) 按细菌或细胞密度计算

ATP 含量 (μmol/10⁴ cell) =[C 标准管 ×(A 测定管 - A 对照管)÷(A 标准管 - A 空白管) ×V1]÷(500×V1÷V2)=0.008×(A 测定管 - A 对照管)÷(A 标准管 - A 空白管)

C 标准管：标准液浓度，2μmol/mL； V1：加入反应体系中样本体积，0.01mL； V2：加入提取液体积，2mL； V3：加入血清（浆）体积：0.1mL； Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； W：样本质量，g； 500：细胞或细菌总数，500 万。

注意：最低检测限为 10nmol/mL 或 10nmol/g 鲜重或 0.1nmol/mg prot