

## ATP 含量试剂盒说明书

### 微量法 100 管/96 样

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：

酶标仪、水浴锅、可调式移液枪、96 孔板、研钵和蒸馏水。

#### 试剂组成和配制：

试剂一：粉剂×1 瓶，4℃ 保存；临用前加入 2.5mL 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 1.2mL 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，0.5 $\mu$ mol/mL ATP 标准液，4℃ 保存；

#### ATP 提取：

**1、组织中 ATP 的提取：**称取约 0.1g 样本，加入 1mL 蒸馏水，冰浴匀浆，100℃ 加热提取 5min，8000g 4℃ 离心 15min，取上清液待测。

**2、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）：蒸馏水（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 蒸馏水），超声波破碎 1min（冰浴，强度 20% 或 200W，超声 2s，停 1s），8000g 4℃ 离心 15min；取上清液待测。

**3、血清（浆）中 ATP 的提取：**取约 0.1mL 血清（浆），加入 1mL 蒸馏水，冰浴匀浆，100℃ 加热提取 5min，8000g 4℃ 离心 15min，取上清液待测。

**测定步骤:**

- 1、酶标仪或分光光度计预热 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	标准管	空白管
样本	10		
标准液		10	10
试剂一	20	20	
试剂二	10	10	10
试剂三	10	10	
蒸馏水			30

充分混匀，37℃准确水浴 30min

显色剂	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。

**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 空白管)÷(A 标准管 - A 空白管)×V1]÷(V3×V1÷V2)=5×(A 测定管 - A 空白管)÷(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 空白管)÷(A 标准管 - A 空白管)×V1]÷(V1÷Cpr) =0.5×(A 测定管 - A 空白管)÷(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 空白管)÷(A 标准管 - A 空白管)×V1]÷(W×V1÷V2)=0.5×(A 测定管 - A 空白管)÷(A 标准管 - A 空白管)÷W

(3) 按细菌或细胞密度计算

ATP 含量 (μmol/10<sup>4</sup> cell)=[C 标准管×(A 测定管 - A 空白管)÷(A 标准管 - A 空白管)×V1]÷(500×V1÷V2)=0.001×(A 测定管 - A 空白管)÷(A 标准管 - A 空白管)

C 标准管：标准液浓度，0.5μmol/mL；V1：加入反应体系中样本体积，0.01mL；V2：加入提取液体积，1mL；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