

ATP 含量测定试剂盒说明书

(微板法 96 样)

一、产品简介:

三磷酸腺苷(ATP)是生物体内能量转换最基本的载体,是生物体内最直接的能量来源,测定 ATP 含量并且计算能荷,能够反映能量代谢状态。

三磷酸腺苷(ATP)在己糖激酶和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶混合酶的作用下,使 ATP 水解并伴随着 NADPH 的生成,通过检测 340nm 下 NADPH 的增加量,进而计算得到 ATP 的含量。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂×1 支	4℃保存	临用前甩几下或离心,使粉剂落入底部,再加 1.1mL 蒸馏水备用。
试剂二	粉剂×1 支	-20℃保存	临用前甩几下或离心,使粉剂落入底部,再加 1.1mL 蒸馏水备用。可-20℃分装冻存。
试剂三	16mL 液体×1 瓶	4℃保存	
试剂四	粉剂×1 支	4℃保存	临用前甩几下或离心,使粉剂落入底部,再加 1.1mL 蒸馏水备用。
标准品	粉剂×1 支	-20℃保存	仅用来鉴定试剂盒中试剂是否正常(不参与结果计算)。 配制方法:用前标准管(ATP)甩几下使粉剂落入底部,再加 0.5mL 蒸馏水混匀溶解即浓度为 20μmol/mL(最好一周内用完),再稀释 10 倍成 2μmol/mL 的 ATP 后备用;按照加样表中的测定管操作(样本更换成备用浓度的标准品)。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、恒温培养箱、可调式移液枪、水浴锅、研钵和蒸馏水。

四、ATP 含量检测:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织加入研钵中,加入 1mL 提取液,进行冰浴匀浆,12000rpm,4℃离心 10min,取上清液,置冰上待测。

【注】:也可以按照组织质量(g):提取液体积(mL)为 1:5~10 的比例提取。

② 细菌/真菌样本:

先收集细菌或细胞到离心管内,离心弃上清;取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液;冰浴超声波破碎细菌或细胞(冰浴,功率 20%或 200W,超声 3S,间隔 10S,重复 30 次);12000rpm,4℃离心 10min,取上清液,置冰上待测。

【注】:也可按照细菌或细胞数量(10^4 个):提取液体积(mL)为 500~1000:1 的比例进行提取。

③ 液体样本:澄清的液体直接检测;若浑浊则离心后取上清检测。

④ 高蛋白含量样本:

④-1:称取约 0.1g 组织加入研钵中,加入 1mL 蒸馏水,进行匀浆,转至 EP 管中,于 95℃水浴中煮 5min,取出冷却至室温后于 12000rpm,室温离心 10min,上清液待测。

④-2: 或称取约 0.1g 组织加入研钵中, 加入 0.5mL 高氯酸 (0.5M), 进行冰浴匀浆, 8000rpm, 4°C离心 10min, 取全部上清至另一 EP 管中, 再加入与上步所取上清液等体积的 KOH 或 NaOH (0.5M) 混匀, 使整个液体 PH 近中性, 若澄清直接检测, 若浑浊则 8000rpm, 4°C离心 5min 后取上清液测定, 此时整个上清液体积记为 V3。

2、上机检测:

- ① 酶标仪预热 30 min 以上, 调节波长到 340nm。
- ② 试剂解冻至室温 (25°C), 或可放在 25°C 条件下水浴 5-15min。
- ③ 试剂一和二和三可按照 10:10:160 比例配成混合液 (一枪加 180μL 该混合液) (该混合液用多少配多少, 现配现用)。
- ④ 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	10
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	160
混匀, 于室温 (25°C) 下孵育 5min 后于 340nm 处读取 A1 值。	
试剂四	10
混匀, 于室温 (25°C) 下孵育 15min 后于 340nm 处读取 A2 值, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】若 ΔA 小于 0.01, 可增加样本量 V1 (如 40μL, 则试剂三相应减少)。或增加样本取样质量 W 和细胞数量, 则改变后的 V1 或 W 或细胞数量需代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、按样本鲜重计算:

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6] \div (W \times V1 \div V) = 6.35 \times \Delta A \div W$$

2、按细菌/细胞密度计算:

$$\text{ATP 含量}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) = 6349.2 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

3、液体中 ATP 含量计算:

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6] \div V1 = 6.35 \times \Delta A$$

4、高蛋白样本中 ATP 含量计算:

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6] \div (W \times V1 \div V) = 6.35 \times \Delta A \div W$$

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6] \div (W \times V1 \div V3) = 6.35 \times \Delta A \div V3 \div W$$

ϵ ---NADPH 的摩尔吸光系数为 $6.3 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$;

d---光径距离, 0.5cm;

V---提取液体积, 1mL;

V1---样本体积, $10\mu\text{L} = 0.01\text{mL}$;

V2---反应总体积, $200\mu\text{L} = 2 \times 10^{-4}\text{L}$;

ATP 分子量---551.14;

V3---高蛋白组织样本最终上清液总体积, mL;

W---样本质量, g;

检测线范围--- $0.06\mu\text{mol/mL} - 4\mu\text{mol/mL}$;

细胞数量---万。