

ATP 含量测定试剂盒说明书

(微板法 48 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。

肌酸激酶催化三磷酸腺苷(ATP)和肌酸生成磷酸肌酸,用磷钼酸比色法进行检测,经波长扫描产物在 700nm 处有最大吸收峰,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 1	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
提取液 2	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	-20℃ 保存	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 瓶	4℃ 保存	
试剂三	粉剂 mg×1 瓶	-20℃ 保存	用前加入 500μL 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	反应液配制: 3.5mL 的试剂四与 17.5mL 的试剂五混匀。
试剂五	液体 20mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准液	液体 1.6mL×1 支	4℃ 保存	

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、水浴锅、可调式移液枪、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 1,进行冰浴匀浆,12000rpm,4℃ 离心 10min,取上清至另一 EP 管中,再加入 1mL 的提取液 2 混匀,若澄清直接检测,若浑浊则 12000rpm,4℃ 离心 5min 后取上清液测定。

【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 1;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,取上清液至另一 EP 管中,再加入 1mL 的提取液 2 混匀,若澄清直接检测,若浑浊则 12000rpm,4℃ 离心 5min 后取上清液测定。

【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：

取 0.1mL 液体加入 1mL 提取液 1,进行冰浴匀浆。12000rpm,4℃ 离心 10min,取上清液至另一 EP 管中,再加入 1mL 的提取液 2 混匀,若澄清直接检测,若浑浊则 12000rpm,4℃ 离心 5min 后取上清液测定。

【注】:也可以按照血清(浆)体积(mL):提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例提取

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30 min 以上,调节波长到 700nm。

② 在 EP 管中依次加入：

试剂名称(μL)	测定管	对照管	标准管	空白管 (仅做一次)
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				
反应液	180	180	180	180
混匀，37℃水浴 20min，液体全部转移至 96 孔板中，在 700nm 下 读取各管吸光值 A（每个测定管需设一个对照管）。				

【注】若 A 测定管值较小，可以增加样本取样质量（如至 0.2g）或增加样本加样量 V1，则相应的反应液可相应减少；则改变后的取样质量 W 和加样体积 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本鲜重计算：

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) = [\text{C 标准} \times (\text{A 测定} - \text{A 对照}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times \text{V1}] \div (\text{W} \times \text{V1} \div \text{V}) \\ = 4 \times (\text{A 测定} - \text{A 对照}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{W}$$

2、按细菌/细胞密度计算：

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = [\text{C 标准} \times (\text{A 测定} - \text{A 对照}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times \text{V1}] \div (500 \times \text{V1} \div \text{V}) \\ = 0.008 \times (\text{A 测定} - \text{A 对照}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白})$$

3、液体中 ATP 含量计算：

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/mL}) = [\text{C 标准} \times (\text{A 测定} - \text{A 对照}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times \text{V1}] \div (\text{V2} \times \text{V1} \div \text{V}) \\ = 40 \times (\text{A 测定} - \text{A 对照}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白})$$

C 标准---标准液浓度，2μmol/mL；

V---加入提取液体积，2mL；

V1---加入反应体系中样本体积，0.01mL；

V2---加入血清（浆）体积，0.1mL；

W---样本质量，g；

500---细胞或细菌总数，500 万。