

ATP 含量试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 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：

分光光度计、水浴锅、可调式移液枪、1mL 石英比色皿、研钵和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

试剂一：粉剂×1 瓶，4℃保存；临用前加入 3.5mL 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 3mL×1 瓶，4℃保存；

试剂三：粉剂×1 瓶，-20℃保存；临用前加入 600μL 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 10mL×1 瓶，4℃保存；

试剂五：液体 50mL×1 瓶，4℃保存；

标准液：液体 10mL×1 瓶，0.5μmol/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、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×0.87m L），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	30		
标准液		30	30
试剂一	60	60	
试剂二	30	30	30
试剂三	10	10	
蒸馏水			70

充分混匀，37℃准确水浴 30min

显色剂	870	870	870
-----	-----	-----	-----

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。

1、血清（浆）中 ATP 含量计算

$$\text{ATP 含量} (\mu\text{mol/mL}) = [C \text{ 标准管} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 5 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})$$

2、组织、细菌或细胞中 ATP 含量计算

(1) 按蛋白浓度计算

$$\text{ATP 含量} (\mu\text{mol/mg prot}) = [C \text{ 标准管} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V1] \div (V1 \div Cpr) = 0.5 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div Cpr$$

蛋白质含量需要另外测定。

(2) 按样本鲜重计算

$$\text{ATP 含量} (\mu\text{mol/g 鲜重}) = [C \text{ 标准管} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 0.5 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

$$\text{ATP 含量} (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = [C \text{ 标准管} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.001 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})$$

C 标准管：标准液浓度，0.5μmol/mL；V1：加入反应体系中样本体积，0.03mL；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