

**ATP含量试剂盒说明书**

微量法 100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/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；

试剂五：液体25mL×1瓶，4℃保存；

标准液：液体10mL×1瓶，2μmol/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<sup>4</sup>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°C准确水浴30min

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

37°C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/10<sup>4</sup> 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**

