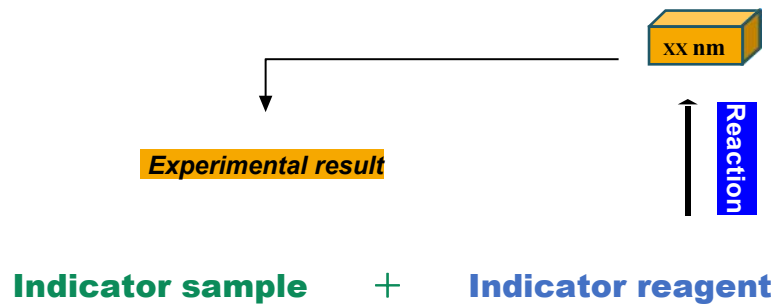


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

ATP 含量检测试剂盒说明书

微量法

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系技术人员。

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 100 mL×1瓶	4℃保存	-
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存	-
试剂三	液体 4 mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂四	粉剂×2 支	-20℃保存	-
试剂五	粉剂×1 瓶	4℃保存	-
试剂六	粉剂×2 支	-20℃保存	-
标准品	粉剂×1 支	-20℃保存	-

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 3.5 mL 蒸馏水充分溶解，可加热促进溶解；
- 2、试剂四：临用前取 1 支加入 0.2 mL 蒸馏水溶解，可分装后-20℃保存，避免反复冻融；
- 3、试剂五：临用前加入 1 mL 蒸馏水；
- 4、试剂六：临用前取 1 支加入 0.25 mL 蒸馏水备用，可分装后-20℃保存，避免反复冻融；
- 5、标准品：5 mg ATP。临用前加入 0.826 mL 蒸馏水配成 10 μmol/mL 的 ATP 标准溶液；
- 6、工作液的配制：临用前请按试剂二(mL)：试剂三(mL)：试剂四(mL)：试剂五(mL)：试剂六(mL)=1：1：0.1：0.4：0.1 的比例配制，现配现用。

产品说明：

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。

HK 催化葡萄糖和 ATP 合成 6-磷酸葡萄糖，6-磷酸葡萄糖脱氢酶进一步催化 6-磷酸葡萄糖脱氢生成 NADPH，NADPH 在 340nm 有特征吸收峰，NADPH 和 ATP 含量成正比，以此反应 ATP 含量。

技术指标：最低检出限：0.0026 $\mu\text{mol/mL}$

线性范围：0.01953-3 $\mu\text{mol/mL}$

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅、可调式移液枪、微量石英比色皿/ 96 孔 UV 板、研钵/匀浆器、蒸馏水和氯仿。

操作步骤：

一、样本处理

注：本试剂盒主要用于组织，细胞等样本的检测，其他类型样本仍在验证阶段

- 1、组织中 ATP 的提取：按照组织质量 (g)：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 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 500 μL 的氯仿充分震荡混匀，10000g 4℃离心 3min，取上清，置冰上待测（不可用于蛋白质含量测定）。
- 2、血清（浆）中 ATP 的提取：按照血清（浆）体积 (mL)：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 提取液），充分震荡，10000g，4℃离心 10min；取上清液至另一 EP 管中，加入 500 μL 的氯仿充分震荡混匀，10000g 4℃离心 3min，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 (10^4 个)：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 提取液），超声波破碎 1min（冰浴，强度 20%或 200W，超声 2s，停 1s），10000g 4℃离心 10min；取上清液至另一 EP 管中，加入 500 μL 的氯仿充分震荡混匀，10000g 4℃离心 3min，取上清，置冰上待测（不可用于蛋白质含量测定）。

二、测定步骤

- 1、紫外分光光度计/酶标仪预热 30 min 以上，调节波长到 340nm，蒸馏水调零。
- 2、将 10 $\mu\text{mol/mL}$ 的 ATP 标准溶液用蒸馏水稀释 16 倍即 0.625 $\mu\text{mol/mL}$ 标准溶液备用。
- 3、加样表：在微量石英比色皿或 96 孔 UV 板中加入

试剂名称 (μL)	测定管	标准管
样本	20	
标准液		20
试剂一	128	128
工作液	52	52

充分混合后，立即测定 340nm 下 10s 的吸光值 A1，然后将比色皿连同反应液一起放入 37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）水浴中反应 3min，拿出擦拭干净立即测定其在 3min10s 时的吸光值 A2。用 96 孔板则放入 37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）培养箱中（酶标仪若自带控温功能，则将温度调至 37℃或 25℃）。分别计算 ΔA 测定=A2 测定管-A1 测定管， ΔA 标准=A2 标准管-A1 标准管。

三、ATP 含量计算

1、血清（浆）中 ATP 含量计算

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/mL}) = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准}) \times (V \text{ 提取} + V \text{ 血清(浆)}) \div V \text{ 血清(浆)} \\ = 6.875 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准}$$

2、组织、细菌或细胞中 ATP 含量计算

(1) 按样本质量计算

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/g 质量}) = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准}) \times V \text{ 提取} \div W \\ = 0.625 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W$$

(2) 按细菌或细胞数量计算

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}) = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准}) \times V \text{ 提取} \div 5 \\ = 0.125 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准}$$

C 标准：标准液浓度， $0.625 \mu\text{mol/mL}$ ；V 提取：加入的提取液体积， 1mL ；V 血清（血浆）：血清（浆）体积， 0.1mL ；W：样本质量，g；5：细胞或细菌总数， 5×10^6 个。

注意事项：

- 1、加入提取液离心后的上清若为浑浊为正常现象。
- 2、提取过程严格在冰浴条件下进行。
- 3、如果吸光值大于 1.5，建议将样本用提取液稀释后进行测定。
- 4、提取液低温条件下，可能有结晶析，放于 60°C 水浴溶解即可，不影响使用。