

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0753

Size: 50T/48S

ATP 含量试剂盒说明书

分光光度法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、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。

三、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。

四、试剂的组成和配制:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
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 600 μL 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	4℃ 保存	0.5 μmol/mL ATP 标准液

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 30min 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 $\times$ 0.87mL), 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 (μ L)	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

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

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

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

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， $0.5 \mu\text{mol/mL}$ ；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