

ATP 含量测定试剂盒说明书

微板法 96 样 有效期：3 个月

一、指标介绍：

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。

三磷酸腺苷(ATP)在己糖激酶和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶混合酶的作用下,使 ATP 水解并伴随着 NADPH 的生成，通过检测 340nm 下 NADPH 的增加量，进而计算得到 ATP 的含量。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加 1.1mL 蒸馏水备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉剂 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加 1.1mL 蒸馏水备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	16mL 液体×1 瓶	4℃保存	若出现晶体析出，则手动摇晃混匀、涡旋混匀 1min、超声混匀 1min（三种方式任选其一即可），混匀后取澄清液体使用。
试剂四	粉剂 1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加 1.1mL 蒸馏水备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

① 组织样本：

称取约 0.1g 组织加入研钵中，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

【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；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，置冰上待测。

【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：澄清的液体直接检测；若浑浊则离心后取上清检测。

④ 高蛋白含量样本：

④-1: 称取约 0.1g 组织加入研钵中，加入 1mL 蒸馏水，进行匀浆，转至 EP 管中，于 95℃水浴中煮 5min，取出冷却至室温后于 12000rpm，室温离心 10min，上清液待测。

④-2: 或称取约 0.1g 组织加入研钵中，加入 0.5mL 高氯酸（0.5M），进行冰浴匀浆，8000rpm，4℃

离心 10min，取全部上清至另一 EP 管中，再加入与上步所取上清液等体积的 KOH 或 NaOH (0.5M) 混匀，使整个液体 PH 近中性，若澄清直接检测，若浑浊则 8000rpm，4℃离心 5min 后取上清液测定，此时整个上清液体积记为 V3。

2、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30 min 以上，调节波长到 340nm。
- ② 在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管
样本	10
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	160
混匀，室温 (25℃) 下，5min后于340nm处读取A1值。	
试剂四	10
混匀，室温 (25℃) 下，反应15min于340nm处读取A2值， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】若 ΔA 差值在零附近，可增加样本量 V1（如 40μL，则试剂三相应减少）。
则改变后的 V1 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本鲜重计算：

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6] \div (W \times V1 \div V) = 6.35 \times \Delta A \div W$$

2、按细菌/细胞密度计算：

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6] \div (500 \times V1 \div V) = 0.013 \times \Delta A$$

3、液体中 ATP 含量计算：

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6] \div V1 = 6.35 \times \Delta A$$

4、高蛋白组织样本中 ATP 含量计算：

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6] \div (W \times V1 \div V3) = 6.35 \times \Delta A \div V3 \div W$$

5、按样本蛋白浓度计算：

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6] \div (Cpr \times V1 \div V) = 6.35 \times \Delta A \div Cpr$$

ϵ ---NADPH的摩尔吸光系数为 $6.3 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ；
 d ---光径距离，0.5cm；
 V ---提取液体积，1mL；
 $V1$ ---样本体积，10μL=0.01mL；
 $V2$ ---反应总体积，200μL= $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；
 $V3$ ---高蛋白组织样本最终上清液总体积，mL；
 W ---样本质量，g；
 ATP分子量---551.14；
 检测线范围---0.06μmol/mL-4μmol/mL；
 Cpr ---蛋白浓度 (mg/mL)；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。