

ATP 含量测定试剂盒说明书

(微板法 96 样)

一、产品简介：

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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂×1 支	4℃保存	临用前甩几下或离心,使粉剂落入底部,再加 1.1mL 蒸馏水备用。
试剂二	粉剂×1 支	-20℃保存	临用前甩几下或离心,使粉剂落入底部,再加 1.1mL 蒸馏水备用。
试剂三	16mL 液体×1 瓶	4℃保存	
试剂四	粉剂×1 支	4℃保存	临用前甩几下或离心,使粉剂落入底部,再加 1.1mL 蒸馏水备用。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、恒温培养箱、可调式移液枪、研钵和蒸馏水。

四、ATP 含量检测：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备：

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、上机检测：

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：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	10
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	160
混匀，室温(25°C)下，5min后于340nm处读取A1值。	
试剂四	10
混匀，室温(25°C)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 V_1 （如 40μL，则试剂三相应减少）。
则改变后的 V_1 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本鲜重计算：

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^6] \div (W \times V_1 \div V) = 6.35 \times \Delta A \div W$$

2、按细菌/细胞密度计算：

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^6] \div (500 \times V_1 \div V) = 0.013 \times \Delta A$$

3、液体中 ATP 含量计算：

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^6] \div V_1 = 6.35 \times \Delta A$$

4、高蛋白样本中 ATP 含量计算：

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^6] \div (W \times V_1 \div V) = 6.35 \times \Delta A \div W$$

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^6] \div (W \times V_1 \div V_3) = 6.35 \times \Delta A \div V_3 \div W$$

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；

V_1 ---样本体积， $10\mu\text{L} = 0.01\text{mL}$ ；

V_2 ---反应总体积， $200\mu\text{L} = 2 \times 10^{-4}\text{L}$ ；

ATP分子量---551.14；

V_3 ---高蛋白组织样本最终上清液总体积，mL；

W ---样本质量，g；

检测线范围--- $0.06\mu\text{mol/mL} - 4\mu\text{mol/mL}$ 。