

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°C保存	
试剂一	粉剂×1 支	4°C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°C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。可-20°C分装冻存。
试剂三	16mL 液体×1 瓶	4°C保存	
试剂四	粉剂×1 支	4°C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。
标准品	粉剂×1 支	-20°C保存	仅用来鉴定试剂盒中试剂是否正常（不参与结果计算）。 配制方法：用前标准管（ATP）甩几下使粉剂落入底部，再加 0.5mL 蒸馏水混匀溶解即浓度为 20μmol/mL（最好一周内用完），再稀释 10 倍成 2μmol/mL 的 ATP 后备用；按照加样表中的测定管操作（样本更换成备用浓度的标准品）。

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、水浴锅、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°C 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°C 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°C 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 试剂解冻至室温（25℃），或可放在 25℃条件下水浴 5-15min。
- ③ 试剂一和二和三可按照 10:10:160 比例配成混合液（一枪加 180μL 该混合液）（该混合液用多少配多少，现配现用）。
- ④ 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，于室温（25℃）下孵育5min后于 340nm处读取A1值。	
试剂四	10
混匀，于室温（25℃）下孵育15min后于 340nm处读取A2值， $\Delta A = A_2 - A_1$ 。	

【注】若 ΔA 小于 0.01，可增加样本量 V1（如 40μL，则试剂三相应减少）。或增加样本取样质量 W 和细胞数量，则改变后的 V1 或 W 或细胞数量需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本鲜重计算：

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

2、按细菌/细胞密度计算：

$$\text{ATP 含量}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V2 \times 10^6] \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) = 6349.2 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

3、液体中 ATP 含量计算：

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

4、高蛋白样本中 ATP 含量计算：

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

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

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;

V1---样本体积， $10\mu\text{L} = 0.01\text{mL}$;

V2---反应总体积， $200\mu\text{L} = 2 \times 10^{-4}\text{L}$;

ATP分子量---551.14;

V3---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---0.06μmol/mL-4μmol/mL;

细胞数量---万。