

## ATP 含量检测试剂盒（分光光度法）

**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。**

### 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。

### 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。

### 试剂组成和配制：

酸性提取液：液体 60mL×1 瓶，4℃ 保存；

碱性提取液：液体 60mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：粉剂×1 支，4℃ 保存；临用前加入 2mL 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 300μL 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，1μmol/mL ATP 标准液，4℃ 保存；

### ATP 提取：

- 1、血清（浆）中 ATP 的提取：**按照血清（浆）体积（mL）：酸性提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议取约 0.1mL 血清（浆），加入 1mL 酸性提取液），进行冰浴匀浆，8000g 4℃ 离心 10min；取上清液至另一 EP 管中，加入等体积的碱性提取液使之中和，混匀，8000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测（不可用于蛋白质含量测定）。
- 2、组织中 ATP 的提取：**按照组织质量（g）：酸性提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 酸性提取液），进行冰浴匀浆，8000g 4℃ 离心 10min，取上清至另一 EP 管中，加入等体积的碱性提取液使之中和，混匀，8000g 4℃ 离心 10min，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<sup>4</sup> 个）：酸性提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 酸性提取液），超声波破碎 1min（冰浴，强度 20% 或 200W，超声 2s，停 1s），8000g 4℃ 离心 10min；取上清液至另一 EP 管中，加入等体积的碱性提取液使之中和，混匀，8000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测（不可用于蛋白质含量测定）。

## 测定步骤:

- 1、分光光度计预热 30 min 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×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(μL)	测定管	对照管	标准管	空白管
样本	30	30		
标准液			30	30
试剂一	60		60	
试剂二	30	30	30	30
试剂三	10		10	
蒸馏水		70		70

充分混匀，37℃准确水浴 30min

显色剂	870	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，每个测定管设一个对照管。**

## ATP 含量计算:

### 1、血清（浆）中 ATP 含量计算

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol}/\text{mL}) = [\text{C 标准管} \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \times \text{V1}] \div (\text{V3} \times \text{V1} \div \text{V2})$$

$$= 20 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})$$

### 2、组织、细菌或细胞中 ATP 含量计算

#### (1) 按蛋白浓度计算

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol}/\text{mg prot}) = [\text{C 标准管} \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \times \text{V1}] \div (\text{V1} \div \text{Cpr})$$

$$= 1 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{Cpr}$$

蛋白质含量需要另外测定。

#### (2) 按样本鲜重计算

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol}/\text{g 鲜重}) = [\text{C 标准管} \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \times \text{V1}] \div (\text{W} \times \text{V1} \div \text{V2})$$

$$= 2 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{W}$$

#### (3) 按细菌或细胞密度计算

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = [\text{C 标准管} \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \times \text{V1}] \div (500 \times \text{V1} \div \text{V2})$$

$$= 0.004 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})$$

C 标准管：标准液浓度，1μmol/mL；

V1：加入反应体系中样本体积，0.03mL；

V2：加入提取液体积，2mL；

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。

## 注意事项:

**最低检测限为 10nmol/mL 或 10nmol/g 鲜重或 0.1nmol/mg prot**