

ATP 含量测定试剂盒说明书

(货号: BP10008F 紫外法 48 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	60mL×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	33mL 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)、1ml 石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、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 紫外分光光度计预热 30 min 以上，调节波长到 340nm，蒸馏水调零。
- ② 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管
样本	40
试剂一	20
试剂二	20
试剂三	600
混匀，室温（25℃）下，5min后于340nm处读取A1值。	
试剂四	20
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 100μL，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：

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6] \div (W \times V1 \div V) = 2.78 \times \Delta A \div W$$

2、按细菌/细胞密度计算：

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6] \div (500 \times V1 \div V) = 0.006 \times \Delta A$$

3、液体中 ATP 含量计算：

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6] \div V1 = 2.78 \times \Delta A$$

4、高蛋白样本中 ATP 含量计算：

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6] \div (W \times V1 \div V) = 2.78 \times \Delta A \div W$$

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6] \div (W \times V1 \div V3) = 2.78 \times \Delta A \div V3 \div W$$

5、按蛋白浓度计算：

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6] \div (Cpr \times V1 \div V) = 2.78 \times \Delta A \div Cpr$$

ϵ ---NADPH的摩尔吸光系数为 $6.3 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； d---光径距离，1cm；

V---提取液体积，1mL；

V1---样本体积，40μL=0.04mL；

V2---反应总体积，700μL= $7 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

ATP分子量---551.14；

W---样本质量，g；

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。