

ATP 含量试剂盒(酶法)

- 【产品简介】**
- ◆糖三磷酸腺苷(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。

【货 号】 TMC016

【规 格】 96T

【包装清单】

试剂名称	规格	保存条件	
提取液	液体100mL×1瓶	4℃	
试剂一	粉剂×1支	4℃	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℃	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℃分装冻存。
试剂三	液体16mL×1瓶	4℃	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。
试剂四	粉剂×1支	4℃	
标准管	粉剂×1支	-20℃	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:20 μmol/mL(最好一周内用完),再稀释10倍成2 μmol/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)。

【保存条件】 4℃保存,有效期一年。

【操作步骤】 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：

-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。

-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180uL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(uL)	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， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

3、结果计算：

①按样本鲜重计算：

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

②按细菌/细胞密度计算：

$$\begin{aligned} \text{ATP含量 (nmol/10}^4\text{cell)} &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V_1 \div V) \\ &= 6349.2 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

③液体中ATP含量计算：

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

④高蛋白样本中ATP含量计算：

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

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

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，10uL=0.01mL；

V_2 反应总体积，200uL= 2×10^{-4} ；

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 $\mu\text{mol/mL}$ ；

细胞数量---万。

【注意事项】

- 1、裂解后样品中的ATP在室温不太稳定，需要在冰上操作。
- 2、对于低于预期水平ATP样品，会采取煮沸，煮沸后打样品蛋白变性，不能用于蛋白浓度检测。
- 3、本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。
- 4、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。