



ATP 含量检测试剂盒 ATP Assay Kit

微量法

产品编号: AK533M
产品规格: 100T/96S
产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES533-提取液	110mL×1 瓶	4℃保存; 提取液低温条件下, 可能有结晶析出, 放于 60℃水浴加热溶解即可, 不影响使用。
AK533-A	20mL×1 瓶	4℃保存
AK533-B	粉剂×1 支	4℃保存; 临用前加入3.5mL蒸馏水充分溶解, 可加热促进溶解; 4℃可保存4周;
AK533-C	4mL×1 瓶	4℃保存;
AK533-D	粉剂×2 支	-20℃保存; 临用前取 1 支加入 0.2mL 蒸馏水充分溶解; 剩余试剂分装后-20℃保存 2 周, 禁止反复冻融
AK533-E	粉剂×1 瓶	4℃保存; 临用前加入 1mL 蒸馏水充分溶解; 剩余试剂分装后-20℃保存 4 周, 禁止反复冻融
AK533-F	粉剂×2 支	-20℃保存; 临用前加入 0.25mL 蒸馏水充分溶解; 剩余试剂分装后-20℃保存 2 周, 禁止反复冻融
AK533-S	粉剂×1 支	-20℃保存; 临用前加入 0.826 mL 蒸馏水配成 10 umol/mL 的 ATP 标准溶液, 用不完的试剂-20℃分装保存 4 周, 避免反复冻融,

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 三磷酸腺苷 (Adenosine triphosphate, ATP) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中, 为一种辅酶, 有改善机体代谢的作用, 参与体内脂肪、蛋白质、糖、核酸以及核苷酸的代谢, 是生物能量的主要来源。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。

原理: HK 催化葡萄糖和 ATP 合成 6-磷酸和葡萄糖, 6-磷酸和葡萄糖脱氢酶进一步催化 6-磷酸葡萄糖脱氢生成 NADPH, NADPH 在 340nm 有特征吸收峰, NADPH 和 ATP 含量成正比, 以此反应 ATP 含量。

自备用品:

紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅、可调式移液枪、微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板)、研钵、氯仿、冰和蒸馏水。

ATP 提取:

1. 血清 (浆) 中 ATP 的提取:

按照血清 (浆) 体积 (mL): ES533-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 ES533-提取液), 进行冰浴匀浆, 10000g 4℃离心 10min; 取上清液至另一 EP 管中, 加入 500ul 的氯仿, 混匀, 10000g 4℃离心 3min, 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): ES533-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 ES533-提取液), 进行冰浴匀浆, 10000g 4℃离心 10min, 取上清至另一 EP 管中, 加入 500ul 的氯仿, 混匀, 10000g 4℃离心 3min, 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（ 10^4 个）：ES533-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 ES533-提取液），超声波破碎 1min（冰浴，强度 20%或 200W，超声 2s，停 1s）， $10000g$ $4^{\circ}C$ 离心 10min；取上清液至另一 EP 管中，加入 500ul 的氯仿，混匀， $10000g$ $4^{\circ}C$ 离心 3min，取上清，置冰上待测（不可用于蛋白质含量测定）。

测定步骤：

1. 分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长到 340nm，蒸馏水调零。
2. 标准溶液的稀释: 取 100uL 10umol/L ATP 标准溶液，加入 1.5mL 蒸馏水，充分混匀，配制成 0.625umol/mL 标准液使用，现用现配。(实验中每管需要 20uL，为减小实验误差，故配制大体积。)
3. 工作液的配制: 临用前请按试剂 B(mL): 试剂 C (mL): 试剂 D(mL): 试剂 E (mL): 试剂 F(mL)= 0.2: 0.2: 0.02: 0.08: 0.02 的比例配制 (0.52mL，约 10T 的量)，现配现用。
4. 试剂 A 在 $37^{\circ}C$ （哺乳动物）或 $25^{\circ}C$ （其他物种）预热 10min。
5. 样本测定：

试剂名称	测定管(μ L)	标准管(μ L)
样本	20	
0.625umol/mL 标准液		20
AK533-A	128	128
工作液	52	52

充分混合后，立即测定 340nm 下 10s 的吸光值 A1，然后将微量石英比色皿连同反应液一起放入 $37^{\circ}C$ （哺乳动物）或 $25^{\circ}C$ （其他物种）水浴锅中准确反应 3min，拿出擦拭干净立即测定其在 3min10s 时的吸光值 A2，用 96 孔 UV 板则放入 $37^{\circ}C$ （哺乳动物）或 $25^{\circ}C$ （其他物种）恒温培养箱中。分别计算 ΔA 测定 = A2 测定 - A1 测定， ΔA 标准 = A2 标准 - A1 标准。

ATP 含量计算公式

1. 血清（浆）中 ATP 含量计算

$$\text{ATP 含量}(\text{umol/mL}) = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准}) \times (V \text{ 提取} + V \text{ 血清(浆)}) \div V \text{ 血清(浆)}$$

$$= 6.875 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准}$$
2. 组织、细菌或细胞中 ATP 含量计算
 - (1) 按蛋白质质量计算

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/g 质量}) = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准}) \times V \text{ 提取} \div W = 0.625 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W$$
 - (2) 按细菌或细胞密度计算

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}) = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准}) \times V \text{ 提取} \div 5 = 0.125 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准}$$

注： C 标准管：标准液浓度，0.625 μ mol/mL； V 提取：加入提取液体积，1mL； V 血清（浆）：加入血清（浆）体积：0.1mL； W：样本质量，g； 5：细胞或细菌总数， 5×10^6 万。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))

注意事项

1. 加入提取液离心后的上清若为浑浊为正常现象。
2. 如果吸光值大于 1.5，建议将样本用蒸饮水稀释后进行测定。注意计算公式中乘以稀释倍数，如果吸光值过低或接近空白，建议加大样本量后进行测定，注意同步修改计算公式。