

ATP 含量检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC0300

规格：50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 50 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 8 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	粉剂×3 支	-20℃保存
试剂五	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂六	粉剂×3 支	-20℃保存
标准品	粉剂×1 支	-20℃保存

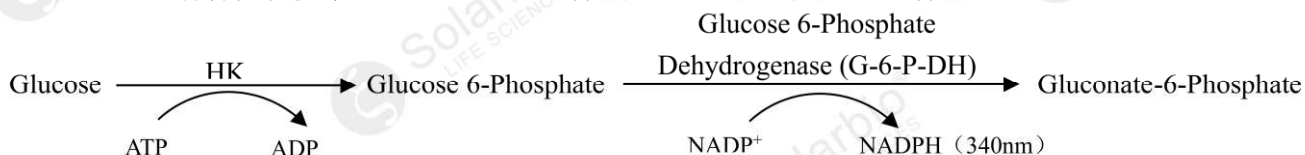
溶液的配制：

1. 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。
2. 试剂二：临用前加入 7 mL 蒸馏水充分溶解，可加热促进溶解，2-8℃可保存 4 周；
3. 试剂四：临用前取 1 支加入 0.2 mL 蒸馏水溶解，用不完的试剂-20℃分装保存 2 周，避免反复冻融（该试剂为冻干试剂，可能存在不同瓶间肉眼观察试剂量相差较大甚至量很少的现象，此现象不影响使用，实际质量相同）；
4. 试剂五：临用前加入 3.2 mL 蒸馏水充分溶解，用不完的试剂-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融；
5. 试剂六：临用前取 1 支加入 0.25 mL 蒸馏水备用，用不完的试剂-20℃分装保存 2 周，避免反复冻融（该试剂为冻干试剂，可能存在不同瓶间肉眼观察试剂量相差较大甚至量很少的现象，此现象不影响使用，实际质量相同）；
6. 标准品：5 mg ATP。临用前加入 0.826 mL 蒸馏水配成 10 μmol/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；
7. 工作液的配制：临用前请按试剂二(mL)：试剂三(mL)：试剂四(mL)：试剂五(mL)：试剂六(mL)=1：1：0.1：0.4：0.1 的比例配制（2.6 mL，约 10T 的量），现配现用。

产品说明：

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。

HK 催化葡萄糖和 ATP 合成 6-磷酸葡萄糖，6-磷酸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。





技术指标:

最低检出限: 0.0023 $\mu\text{mol/mL}$

线性范围: 0.0390625-2.5 $\mu\text{mol/mL}$

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。

需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计、水浴锅/恒温培养箱、低温离心机、可调式移液枪、1mL 石英比色皿、研钵/匀浆器、蒸馏水、冰和氯仿 (>98%, AR)。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

- 1、血清 (浆) 中 ATP 的提取: 按照血清 (浆) 体积 (mL): 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 提取液), 充分震荡, 10000g, 4°C 离心 10min; 取上清液至另一 EP 管中, 加入 500 μL 的氯仿充分震荡混匀, 10000g 4°C 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): 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 提取液), 进行冰浴匀浆, 10000g 4°C 离心 10min, 取上清至另一 EP 管中, 加入 500 μL 的氯仿充分震荡混匀, 10000g 4°C 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): 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 提取液), 超声波破碎 (冰浴, 功率 200W, 超声 2s, 停 1s, 总时间 1min), 10000g 4°C 离心 10min; 取上清液至另一 EP 管中, 加入 500 μL 的氯仿充分震荡混匀, 10000g 4°C 离心 3min, 取上清, 置冰上待测 (不可用于蛋白质含量测定)。

注: 以上提取过程严格控制在冰浴条件下进行。

二、测定步骤

- 1、紫外分光光度计预热 30min 以上, 调节波长到 340nm, 蒸馏水调零。
- 2、标准溶液的稀释: 取 100 μL 10 $\mu\text{mol/mL}$ ATP 标准溶液, 加入 1.5mL 蒸馏水, 充分混匀, 配制成 0.625 $\mu\text{mol/mL}$ 标准液使用, 现用现配。(实验中每管需要 100 μL , 为减小实验误差, 故配制大体积。)
- 3、试剂一 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其他物种) 预热 10min。
- 4、样本测定:

试剂名称(μL)	测定管	标准管
样本	100	-
0.625 $\mu\text{mol/mL}$ 标准液	-	100
试剂一	640	640
工作液	260	260

将上述试剂分别加入 1mL 石英比色皿后迅速吹打混匀, 记录第 10s 的吸光值 A1 测定和 A1 标准, 迅速置于 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其他物种) 水浴锅/恒温培养箱中准确反应 3min, 拿出迅速擦干测定 3min10s 时的吸光值 A2 测定和 A2 标准, 计算 ΔA 测定=A2 测定-A1 测定, ΔA 标准=A2 标准-A1 标准。

三、ATP 含量计算

- 1、血清 (浆) 中 ATP 含量计算



$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/mL}) = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准}) \times (V \text{ 提取} + V \text{ 血清(浆)}) \div V \text{ 血清(浆)} \\ = 6.875 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准}$$

2、组织、细菌或细胞中 ATP 含量计算

(1) 按样本质量计算

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/g 质量}) = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准}) \times V \text{ 提取} \div W \\ = 0.625 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W$$

(2) 按细菌或细胞数量计算

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

C 标准: 标准液浓度, 0.625 $\mu\text{mol/mL}$; V 提取: 加入的提取液体积, 1mL; V 血清(血浆): 血清(浆)体积, 0.1mL; W: 样本质量, g; 5: 细胞或细菌总数, 5×10^6 个。

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 1.1, 建议将样本用蒸馏水稀释后进行测定。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。

实验实例:

- 1、取 0.1g 兔肺脏加入 1mL 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 500 μL 的氯仿充分震荡混匀, 10000g 4℃离心 3min, 取上清, 置冰上按照测定步骤操作, 测得计算 $\Delta A \text{ 测定} = A2 \text{ 测定} - A1 \text{ 测定} = 0.083 - 0.066 = 0.017$, $\Delta A \text{ 标准} = A2 \text{ 标准} - A1 \text{ 标准} = 0.430 - 0.191 = 0.239$, 按样本质量计算含量得:
 $\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/g 质量}) = 0.625 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W = 0.625 \times 0.017 \div 0.239 \div 0.1 = 0.445 \mu\text{mol/g 质量}$ 。
- 2、取 0.1g 稗草加入 1mL 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 500 μL 的氯仿充分震荡混匀, 10000g 4℃离心 3min, 取上清, 置冰上按照测定步骤操作, 测得计算 $\Delta A \text{ 测定} = A2 \text{ 测定} - A1 \text{ 测定} = 0.511 - 0.479 = 0.032$, $\Delta A \text{ 标准} = A2 \text{ 标准} - A1 \text{ 标准} = 0.430 - 0.191 = 0.239$, 按样本质量计算含量得:
 $\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/g 质量}) = 0.625 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W = 0.625 \times 0.032 \div 0.239 \div 0.1 = 0.837 \mu\text{mol/g 质量}$ 。
- 3、取兔血清 0.1mL 加入 1mL 提取液, 充分震荡, 10000g, 4℃离心 10min; 取上清液至另一 EP 管中, 加入 500 μL 的氯仿充分震荡混匀, 10000g 4℃离心 3min, 取上清置冰上检测, $\Delta A \text{ 测定} = A2 \text{ 测定} - A1 \text{ 测定} = 0.051 - 0.038 = 0.013$, $\Delta A \text{ 标准} = A2 \text{ 标准} - A1 \text{ 标准} = 0.430 - 0.191 = 0.239$, 按液体体积计算含量得:
 $\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/mL}) = 6.875 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} = 6.875 \times 0.013 \div 0.239 = 0.374 \mu\text{mol/mL}$ 。

相关发表文献:

- [1] Li C, Zhang X, Yang B, Wei F, Ren Y, Mu W, Han X. Reversible Deformation of Artificial Cell Colonies Triggered by Actin Polymerization for Muscle Behavior Mimicry. Adv Mater. 2022 Aug;34(34):e2204039. doi: 10.1002/adma.202204039. Epub 2022 Jul 17. PMID: 35765153.
- [2] Yan B, Liu C, Li H, Wen N, Jiao W, Wang S, Zhang Y, Zhang T, Zhang H, Lv Y, Fan H, Liu X. Reversal of HMGA1-Mediated Immunosuppression Synergizes with Immunogenic Magnetothermodynamic for Improved Hepatocellular Carcinoma Therapy. ACS Nano. 2023 May 23;17(10):9209-9223. doi: 10.1021/acsnano.3c00004. Epub 2023 May 10. PMID: 37162457.





- [3] Cui T, Zhang Y, Qin G, Wei Y, Yang J, Huang Y, Ren J, Qu X. A neutrophil mimicking metal-porphyrin-based nanodevice loaded with porcine pancreatic elastase for cancer therapy. Nat Commun. 2023 Apr 8;14(1):1974. doi: 10.1038/s41467-023-37580-z. PMID: 37031242; PMCID: PMC10082843.
- [4] Xue S, Liu X, Pan Y, Xiao C, Feng Y, Zheng L, Zhao M, Huang M. Comprehensive Analysis of Signal Peptides in *Saccharomyces cerevisiae* Reveals Features for Efficient Secretion. Adv Sci (Weinh). 2023 Jan;10(2):e2203433. doi: 10.1002/advs.202203433. Epub 2022 Dec 7. Erratum in: Adv Sci (Weinh). 2023 Feb;10(6):e2300302. PMID: 36478443; PMCID: PMC9839866.

参考文献:

- [1] Lin X, Wu Y, Chen X, et al. Determination of adenosine phosphate in tobacco leaf by UPLC with phenol-TEA pretreatment [J]. Acta Tabacaria Sinica, 2014, 20(1): 26-31.
- [2] Beutler E, Mathai C K. A comparison of normal red cell ATP levels as measured by the firefly system and the hexokinase system[J]. Blood, 1967, 30(3): 311-320.

相关系列产品:

- BC0060/BC0065 Na^+K^+ -ATP 酶活性检测试剂盒
- BC0960/BC0965 $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ -ATP 酶活性检测试剂盒

