

## ATP Content Assay Kit

### ATP 含量测定试剂盒(酶法) 微板法

产品编号	产品名称	规格
BL852B	ATP含量测定试剂盒(酶法) 微板法	96T

#### 产品简介:

ATP, 又称为三磷酸腺苷, 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。通常细胞在凋亡、坏死或处于一些毒性状态下, ATP 水平会下降; 在高葡萄糖等刺激可上调某些细胞内的 ATP 水平。而 ATP 水平的下降表明线粒体的功能受损或下降, 在细胞凋亡时 ATP 水平的下降通常和线粒体的膜电位下降同时发生。

本试剂盒通过 ATP 在己糖激酶和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶的混合作用下, 使 ATP 水解并生产 NADPH, 通过检测 340nm 下 NADPH 的增加量, 进而计算得到 ATP 的含量。

#### 产品组成:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉末 ×1 支	4°C保存	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	粉末 ×1 支	-20°C保存	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。
试剂三	16mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	粉末 ×1 支	4°C保存	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。
标准品	粉末 ×1 支	-20°C保存	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 $\mu$ mol/mL(最好一周内用完), 再稀释 10 倍成 2 $\mu$ mol/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)。

#### 使用方法:

建议正式实验前, 选取 2 个样本做预测定, 了解实验样品情况, 熟悉流程, 避免样本和试剂浪费!

##### 一、样本准备

##### 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°C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/细胞样本:

- 收集细菌或细胞到离心管内, 离心弃上清;
- 取  $5 \times 10^6$  个细菌或细胞加入 1mL 提取液, 冰浴超声波破碎细菌或细胞(冰浴, 强度 20% 或 200W, 超声 3S, 间隔 10S, 重复 30 次);
- 12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清液, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照每  $0.5 \sim 1 \times 10^7$  个细菌/细胞数量加入 1mL 提取液进行提取

##### 3. 液体样本:

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.

注意: 在体外研究使用, 不用于诊断或治疗用途, 本产品不是医疗装置。



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；
- 匀浆液转至离心管中，于 95°C 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°C 离心 10min，取全部上清至另一离心管中；
- 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°C 离心 5min 后取上清液测定，此时整个上清液体积记为 V3。

## 二、样品测定

- 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。
- 试剂一和二和三可按照 10:10:160 比例配成混合液（一枪加 180μL 该混合溶液）（该混合液用多少配多少，现配现用）。
- 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	10
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	160
混匀，室温 (25°C) 下，5min 后于 340nm 处读取各管的 A1 值	
试剂四	10
混匀，室温 (25°C) 下，反应 15min 于 340nm 处读取各管的 A2 值， $\Delta A = A2 - A1$	

【注】若  $\Delta A$  小于 0.01，可增加样本量 V1（如 40μL，则试剂三相应减少）。或增加样本取样质量 W 和细胞数量，则改变后的 V1 或 W 或细胞数量需代入公式重新计算。

## 三、含量计算

### 1. 按样本质量计算：

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6] \div (W \times V1 \div V) = 6.35 \times \Delta A \div W$$

### 2. 按细菌/细胞密度计算：

$$\text{ATP 含量}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) = 6349.2 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

### 3. 液体中 ATP 含量计算：

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6] \div V1 = 6.35 \times \Delta A$$

### 4. 高蛋白样本中 ATP 含量计算：

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6] \div (W \times V1 \div V) = 6.35 \times \Delta A \div W$$

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6] \div (W \times V1 \div V3) = 6.35 \times \Delta A \div V3 \div W$$

d---光径距离，0.5cm

$\epsilon$ ---NADPH 的摩尔吸光系数为  $6.3 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$

V2---反应总体积，200μL= $2 \times 10^{-4} \text{ L}$

ATP 分子量---551.14

细胞数量---万

V---提取液体积，1mL

V1---样本体积，10μL=0.01mL

V3---高蛋白组织样本上清体积，mL

W---样本质量，g

检测线范围---0.06μmo/mL-4μmol/mL。

## 注意事项：

- 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。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 有效期：

-20°C 保存三个月。

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.

注意：在体外研究使用，不用于诊断或治疗用途，本产品不是医疗装置。

