



# ATP 活性试剂盒

规格：48 样

检测波长：450nm

编号：TW57766

检测原理：微量法

## 注意

正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定。

## 测定意义

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。

## 测定原理

己糖激酶（HK）催化葡萄糖和 ATP 生成 6-磷酸葡萄糖，后者在 6-磷酸葡萄糖脱氢酶作用下生成 NADPH。NADPH 在电子耦合试剂存在下，将 WST-8 还原为水溶性橙黄色的 formazan，该产物在 450nm 处有特征吸收峰。

## 自备实验用品及仪器

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、研钵和蒸馏水。

## 试剂盒组分与配制

酸性提取液：液体 60mL×1 瓶，4°C 保存；

碱性提取液：液体 60mL×1 瓶，4°C 保存；

试剂一：液体 0.75mL×1 支，-20°C 避光保存；

试剂二：液体 10mL×1 瓶，-20°C 避光保存；



试剂三：液体 0.75mL×1 支，-20℃避光保存；

试剂四：液体 1 mL×1，-20℃避光保存；

**2. 标准品：**粉剂 x1 支，-20℃避光保存；(临用前加入 985.8μL 蒸馏水配成 10μmol/mL 的 ATP 标准溶液，然后稀释 20 倍配置成 0.5μmol/mL 的标准液)

## ATP 提取

**1、血清 (浆) 中 ATP 的提取：**按照血清 (浆) 体积 (mL)：酸性提取液体积 (mL) 为 1：5~10 的比例 (建议取约 0.1mL 血清 (浆)，加入 1mL 酸性提取液)，进行冰浴匀浆，8000g 4 °C离心 10min；取上清液至另一 EP 管中，加入约等体积的碱性提取液使之 PH 为 6-7，混匀，8000g 4 °C离心 10min，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)：酸性提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 酸性提取液)，进行冰浴匀浆，8000g 4°C离心 10min，取上清至另一 EP 管中，加入约等体积的碱性提取液使之 PH 为 6-7，混匀，8000g 4 °C离心 10min，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)：酸性提取液体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 酸性提取液)，超声波破碎 1min (冰浴，强度 20%或 200W，超声 2s，停 1s)，8000g 4 °C离心 10min；取上清液至另一 EP 管中，加入约等体积的碱性提取液使之 PH 为 6-7，混匀，8000g 4 °C离心 10min，取上清，置冰上待测 (不可用于蛋白质含量测定)。

## 测定步骤

**1、酶标仪预热** 30min 以上，设置温度 25°C，调节波长至 450nm，蒸馏水调零。

**2、加样表** (在 EP 管或 96 孔板中加入下列试剂)：



试剂 (μL)	空白管 (只做一管)	标准管 (只做一管)	测定管
样本	-	-	10
0.5μmol/mL 标准液	-	10	-
蒸馏水	10	-	-
试剂一	10	10	10
试剂二	150	150	150
试剂四	10	10	10
混匀, 室温 (25°C) 下避光孵育 5min 后于 450nm 读取吸光值 A1			
试剂三	10	10	10
混匀, 室温 (25°C) 避光孵育 30min 后于 450nm 读取吸光值 A2。 $\Delta A$ 测定=(A2-A1)测定-(A2-A1)空白, $\Delta A$ 标准=(A2-A1)标准-(A2-A1)空白。			

**注意：空白管和标准管通常只需要各做一个。**

### ATP 含量计算：

#### 1、血清（浆）中 ATP 含量计算

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/mL}) = [\text{C 标准} \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2)$$

#### 2、组织、细菌或细胞中 ATP 含量计算

##### (1) 按蛋白浓度计算

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/mg prot}) = [\text{C 标准} \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \times V1] \div (V1 \div \text{Cpr})$$

蛋白质含量需要另外测定。

##### (2) 按样本鲜重计算

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) = [\text{C 标准} \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \times V1] \div (W \times V1 \div V2)$$

##### (3) 按细菌或细胞密度计算

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = [\text{C 标准} \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \times V1] \div (500 \times V1 \div V2)$$

C 标准：标准液浓度，0.5μmol/mL； V1：加入反应体系中样本体积，0.01mL； V2：

加入提取液体积，默认为 2mL； V3：加入血清（浆）体积：0.1mL；

Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； W：样本质量，g；



500: 细胞或细菌总数, 500 万。

## **预实验的意义**

### **比色法检测试剂盒预实验非常重要**

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过 3 - 5 组预实验，判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。