



# ATP 含量测试盒说明书(精简版)

(货号: A095-2 200T 化学发光法)

## 一、测定意义:

三磷酸腺苷 (Adenosine 5'-triphosphate, ATP) 是生物体内能量转换最基本的载体, 其含量的变化直接关系到各器官的能量代谢。ATP 作为最重要的能量分子在细胞的各种生理、病理过程中起着重要作用。ATP 水平的改变, 会影响许多细胞的功能。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, 而高葡萄糖刺激等对于一些细胞可以上调细胞内 ATP 水平。通常 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。

## 二、测试原理:

本试剂盒根据萤火虫荧光素酶 (Firefly Luciferase) 催化荧光素产生荧光时需要 ATP 提供能量研制而成。当萤火虫荧光素酶和荧光素都过量时, 在一定的浓度范围内荧光的产生和 ATP 的浓度成正比。这样就可以高灵敏地检测溶液中的 ATP 浓度。

本试剂盒在样品体积为 100 $\mu$ L 时可以检测浓度低达 1nmol/L 的 ATP。而常规的细胞或组织裂解液中 ATP 的浓度仅为 0.1-1 $\mu$ mol/L, 一些常见细胞的细胞内 ATP 水平约为 10nmol/mg 蛋白。

## 三、试剂组成及配制:

试剂组成	试剂名称	包装规格
R1	裂解液	100ml
R2	底物酶贮备液	0.5ml $\times$ 4 支
R3	底物酶稀释液	20ml
临用前, 取适量酶贮备液, 用酶稀释液按照 1:9 的比例稀释, 配制成酶工作液。现用现配。		
R4	标准品	0.1ml

## 四、保存条件:

-20 $^{\circ}$ C 保存 6 个月。-80 $^{\circ}$ C 可保存一年。底物酶贮备液需避光保存。

## 五、样本前处理:

### 1、贴壁细胞:

吸除培养液, 按照 6 孔板每孔加入 200 $\mu$ L 裂解液裂解细胞。裂解细胞时为了裂解充分, 可以使用移液器进行反复吹打, 或晃动培养板使裂解液充分接触并裂解细胞。通常细胞在接触裂解液后会立即裂解。裂解后 4 $^{\circ}$ C, 12000g 离心 5 分钟, 取上清, 用于后续的测定。

### 2、悬浮细胞:

用离心管离心沉淀细胞, 弃上清, 轻轻弹散细胞, 按照 6 孔板每孔加入 200 $\mu$ L 裂解液裂解细胞。裂解细胞时为了裂解充分, 可以弹击离心管管底, 适当 Vortex 使裂解液充分接触并裂解细胞。通常细胞在接触裂解液后会立即裂解。裂解后 4 $^{\circ}$ C, 12000g 离心 5 分钟, 取上清, 用于后续的测定。

### 3、组织样本:

按照每 20 毫克组织加入约 100-200 $\mu$ L 裂解液的比例加入裂解液, 然后用玻璃匀浆器或其它匀浆设备进行匀浆。充分匀浆可确保组织被完全裂解。裂解后 4 $^{\circ}$ C, 12000g 离心 5 分钟, 取上清, 用于后续的测定。

## 六、操作步骤

- 加 100 $\mu$ L 酶工作液到检测孔或检测管内。室温放置 3-5 分钟, 以使本底性的 ATP 全部被消耗掉, 从而降低本底。可以一次性把 10-20 个检测孔或检测管分别加上 100 $\mu$ L 酶工作液, 从而节省时间。
- 在检测孔或检测管内加上 20 微升样品或标准品, 迅速用枪 (微量移液器) 混匀, 至少间隔 2 秒后, 用 Luminometer 或液闪仪测定 RLU 值或 CPM。
- 为了消除样品制备时由于蛋白量的差异而造成的误差,

可以用南京建成生产的蛋白浓度测定试剂盒测定样品中的蛋白浓度。然后把 ATP 的浓度换算成 nmol/mg 蛋白的形式。

## 七、注意事项:

- 酶贮备液中含有荧光素酶, 反复冻融会导致其逐渐失活。建议使用时的冻融次数不宜超过 3 次。酶贮备液稀释成酶工作液后, 最好一次用完, 不宜冻存后再使用。
- ATP, 特别是裂解后样品中的 ATP 在室温不太稳定, 需在 4 $^{\circ}$ C 或冰上操作。ATP 在冰上可以稳定达 6 小时。
- 本试剂盒需使用化学发光仪 (Luminometer)。如果没有化学发光仪, 也可以使用液闪仪。液闪仪的测定效果取决于其检测灵敏度和检测精度。
- 测定之前建议先做预实验, 样品的体积可以自行在 10-100 $\mu$ L 范围内调节。如果样品中的 ATP 浓度比较低, 则可以加入 100 $\mu$ L 样品, 如果样品中 ATP 浓度比较高, 则可以加入小体积的样品, 同时标准品也需要使用相同的体积。如果样品中 ATP 的浓度特别高, 可以用裂解液稀释样品后再测定。
- 使用可检测化学发光的多功能酶标仪时, 所用 96 孔板宜为孔和孔之间不透光的黑板或白板。如使用常规的透明 96 孔板, 需特别注意正确设置酶标仪测定时板子的类型, 同时也可以检测孔之间设置间隔孔, 以尽量避免邻近孔之间的相互干扰。
- 本试剂盒提供的裂解液可以有效裂解并释放常见的培养细胞和组织中的 ATP。对于一些特殊的组织或样品, 如果发现检测出来的 ATP 水平显著低于预期水平, 可以在裂解样品后并且在离心前, 取部分样品煮沸 2 分钟以充分释放 ATP。煮沸后样品中的蛋白会变性, 从而会在后续的离心步骤中被沉淀, 因此煮沸的样品不能用于蛋白浓度测定、SDS-PAGE 和 Western 检测。可以使用剩余的部分样品进行蛋白浓度测定、SDS-PAGE 和 Western 检测。
- 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, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 八、产品特点:

- 适用范围广**, 本试剂盒可用于检测组织、细胞中 ATP 含量。
- 灵敏度高**, 本试剂盒最低可检测 1nmol/L 的 ATP。
- 样本制备简单**, 本试剂盒提供了可以用于细胞和组织裂解的裂解液, 简单裂解后即可用于 ATP 检测。无需进行高氯酸或三氯乙酸 (TCA) 抽提, 煮沸等繁琐操作。
- 稳定性高**, 本试剂盒进行了特殊的优化设计, 使检测 ATP 时的化学发光非常稳定。对于 ATP 标准曲线的检测结果显示, 在开始反应后 10 分钟内化学发光无明显下降, 开始反应后 30 分钟内化学发光的下降不超过 10%。
- 测定多样性**, 使用本试剂盒中的裂解液裂解获得的细胞或组织样品, 不仅可以用于 ATP 检测, 还可用于检测蛋白浓度、进行 SDS-PAGE 或一些常规的较易溶解蛋白的 Western 检测。
- 方便快捷**, 本试剂盒的使用方便快捷, 通常 10-20 个样品可以在 30-60 分钟内测定完毕。



## 附录 I：标准曲线制备

### 1、标准品制备：

冰浴上溶解待用试剂，把 0.5mmol/L 的 ATP 标准溶液用裂解液稀释成 0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2 $\mu$ mol/L 的不同浓度的标准品应用液，待测。

### 2、标准曲线制备：

a、加 100 $\mu$ L 酶工作液到检测孔内。室温放置 5 分钟，以使本底性的 ATP 全部被消耗掉，从而降低本底。

b、在检测孔内加上 20 $\mu$ L 标准品，迅速用微量移液器混匀，间隔 2 秒后，用 Luminometer 测定 RLU 值。

### 3、测定结果：

