

ATP 含量测试盒说明书

(货号: A095-1-1 可见光比色法 100 管/48 样)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验, 否则由此导致的后果用户自行承担!

一、检测意义:

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状态。ATP 含量测定试剂盒可以用于检测红细胞或组织内的 ATP 水平。

二、测定原理:

肌酸激酶催化三磷酸腺苷和肌酸,生成磷酸肌酸,用磷酸钼比色法检测生成的磷的量,从而计算出 ATP 含量。

三、所需仪器及试剂:

可见光分光光度计及 0.5cm 光径比色皿 (或酶标仪 (636±10nm) 及 96 孔板), 涡旋混匀器, 37℃ 水浴锅或恒温箱, 离心机, 沸水浴锅,

四、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 6 个月)

	组份	规格	保存
试剂一	底物 I 粉剂	粉剂×1 瓶	室温
	试剂一溶液配制: 用时每瓶粉剂加 10mL 双蒸水 (沸水浴加热) 溶解; 临用前观察, 如有结晶, 可再次沸水浴溶解后置于 37℃ 保存待测。		
试剂二	底物 II 溶液	20mL×1 瓶	4℃
试剂三	促进剂	粉剂×2 支	-20℃
		稀释液 760μL×2 支	4℃
试剂三应用液配制: 临用前将一支稀释液加入到一支粉剂中溶解后使用, 用不完的 -20℃ 以下保存, 2 周内有效 (避免反复冻融)。			
试剂四	终止剂	液体 5.5mL×1 瓶	4℃
试剂五	显色剂	甲液 7 mL×4 瓶	4℃
		乙液 6 mL×4 瓶	4℃
显色应用液的配制: 用时取一瓶试剂五甲液加入一瓶试剂五乙液中 (或是按 7:6 的比例配制, 用多少配多少), 充分混匀 4℃ 待用, 现用现配 (配好后静置半小时再用)。(注: 试剂五乙液在保存一段时间后可能会有絮状物存在, 此时可以将其 60℃ 加热 10 分钟左右溶解后再使用)			
试剂六	稳定剂	50mL×1 瓶	室温
试剂七	ATP 标准品	粉剂×2 支	4℃
	标准品配制: 将一支标准品粉剂加 1mL 双蒸水充分溶解配成 5mmol/L ATP 标准品贮备液 (4℃ 可保存一周); 再取部分 5mmol/L 标准品贮备液用双蒸水 1: 4 稀释, 充分混匀后配成 1mmol/L ATP 标准液 (现配现用)。		
试剂八	双蒸水	40mL×1 瓶	4℃ 或室温

[注]: 本试剂盒开始使用后尽量在 1 个月内用完。

五、样本前处理:

1、**红细胞:** 抗凝全血取下层压积红细胞, 一般按 1: 4 的体积比加双蒸水进行稀释, 再混匀使溶血完全, 制备成溶血液。将制好的溶血液加入玻璃试管中沸水加热煮 10 分钟, 取出涡旋混匀 1 分钟, 4000 转/分钟, 离心 10 分钟, 取上清液待测。

2、**组织样本:** 准确称取组织, 按重量 (g): 体积 (mL)=1:

9 的比例, 加入 9 倍体积的冷双蒸水, 冰水浴匀浆, 制成 10% 的匀浆液 (取出部分 3500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清测定蛋白浓度), 再置于沸水浴中煮 10 分钟, 取出涡旋混匀 1 分钟, 3500 转/分离心 10 分钟, 取上清液待测。

3、**普通培养细胞:** 收集细胞后先 1000 转/分离心 5 分钟, 将细胞与培养上清分离, 除去培养上清, 得到下层沉淀细胞 (一般细胞数量不低于 10⁶), 将收集好的细胞加入 300~500μL 冷双蒸水, 置于冰水浴中匀浆 (或超声) 破碎 (取出部分测定蛋白浓度), 后将细胞匀浆液于沸水浴中加热 10 分钟, 取出涡旋混匀 1 分钟, 即可用于测定。

六、**操作表:** (批量实验时, 可将试剂一溶液、试剂二、试剂三应用液 (或是双蒸水) 按操作表加样比例预先混合好, 一次性加入反应, 但配好的混合液需尽快使用)

	空白管	标准管	测定管	对照管
1mmol/L 标准液 (μL)	30	30		
样本 (μL)			30	30
试剂一溶液 (μL)	100	100	100	100
试剂二 (μL)	200	200	200	200
试剂三应用液 (μL)		30	30	
双蒸水 (μL)	30			30
混匀, 37℃ 水浴 30 分钟				
试剂四 (μL)	50	50	50	50
充分混匀后, 4000 转/分, 离心 5 分钟, 取上清液 300μL 进行下一步显色反应				
上清液 (μL)	300	300	300	300
显色应用液 (μL)	500	500	500	500
混匀, 室温静置 2 分钟				
试剂六 (μL)	500	500	500	500
混匀, 37℃ 静置 5-10 分钟, 波长 636nm, 光径 0.5cm, 双蒸水调零, 分光光度计测各管吸光度值 A (或是每管吸出 200μL 反应液, 加到 96 孔板中, 酶标仪 636nm 处读数)				

[注]: 在分光光度计比色前将比色皿用双蒸水洗 4~5 次, 以免磷污染。

七、计算公式及举例

1、红细胞中 ATP 含量计算公式:

$$\text{ATP 含量} (\mu\text{mol/gHb}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N \div C_{\text{Hb}}$$

2、组织 (或普通细胞) 中 ATP 含量按蛋白计算公式:

$$\text{ATP 含量} (\mu\text{mol/g 蛋白}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N \div C_{\text{pr}}$$

3、组织中 ATP 含量按鲜重计算公式:

$$\text{ATP 含量} (\mu\text{mol/g 组织}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N \div \frac{W}{V_{\text{样总}}}$$

4、普通细胞中 ATP 含量按细胞数计算公式:

$$\text{ATP 含量} (\mu\text{mol}/10^4 \text{ 细胞}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N \div \frac{\text{细胞总数}}{V_{\text{样总}}}$$

以上公式中:

C_{标准}: 标准品浓度, 1000μmol/L;

N: 样本测定前的稀释倍数;

C_{Hb}: 血红蛋白浓度, gHb/L (Hb 即血红蛋白);

C_{pr}: 匀浆液蛋白浓度, g/L;

W: 组织重量, g;

细胞总数: 在细胞破碎前细胞计数的总数, 10⁴ 个;

V_{样总}: 匀浆液总体积, L。



八、注意事项：

- 1、此法具有微量、灵敏、快速的特点。对测定所用试管要求严格，要求不能有任何磷污染，**建议最好用一次性塑料试管（本公司有售）；避免磷污染是检测成败的关键；**
- 2、显色应用液配好后，不可放置太久，一般可保存五天，最好当天用当天配（提前半小时配好）；
- 3、本公司有优质的一次性塑料试管供应，建议您在订购试剂盒的同时订购一次性塑料试管；
- 4、**红细胞血红蛋白（Hb）的测定可用本公司的 C021 血红蛋白测试液测定；**组织中蛋白含量可用本公司的 **A045-3/-4BCA 蛋白测定试剂盒**或者 **A045-2 总蛋白含量测定试剂盒（考马斯亮蓝法）**进行测定；
- 5、组织匀浆宜用 5%~10%浓度的匀浆上清(建议做预试来决定上样浓度)，若样本磷浓度过高，则底色过深（对照管 OD 过高或大于 1.0），需注意加样的准确性(样本本身的磷带来的干扰较大,操作不当容易使结果不准或产生负值)；一般通过做预试验将对照 OD 值控制在 1.0 以下。