

ATP 含量测试盒

(货号: BC102 比色法 100 管/48 样)

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, 用磷钼酸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, 涡旋混匀器, 37°C 水浴锅或恒温箱, 离心机, 沸水浴锅,

四、试剂组成及配制: (本试剂盒附送双蒸水一瓶, 供客户配试剂时使用)

	组份	规格	保存
试剂一	底物液 I	粉剂×1瓶	室温
底物液 I 配制: 用时加10ml煮沸双蒸水溶解, 并沸水浴使溶解完全; 临用前观察如有结晶, 可沸水浴溶解后置于37°C保存待测。			
试剂二	底物液 II	20ml×1瓶	4°C
试剂三	促进剂	粉剂×2支	-20°C
		液体760μL×2瓶	4°C
临用前一支试剂三粉剂加入到一支试剂三液体中溶解后使用。			
试剂四	沉淀剂	液体5.5ml×1瓶	4°C
试剂五	显色剂	甲液7 ml×4瓶	4°C
		乙液6 ml×4瓶	4°C
显色应用液的配制: 用时取一瓶显色剂甲液加入一瓶显色剂乙液中, 充分混匀4°C待用, 现用现配(配好后静置半小时再用)。(注: 试剂五乙液在低温时可能会有絮状沉淀, 此时可以将其60°C加热10分钟左右溶解后再使用)			
试剂六	终止剂	50ml×1瓶	室温
试剂七	ATP标准品	粉剂×2支	4°C
5mmol/L ATP 标准品贮备液配制: 用时加双蒸水定容至 1ml, 制备 5mmol/L ATP 标准品贮备液。			
1mmol/L ATP标准品应用液配制: 将标准品贮备液与双蒸水1: 4稀释, 即5倍稀释。			
试剂八	双蒸水	40ml×1瓶	4°C或室温

[注]: 本试剂盒中 ATP3# 粉剂-20°C冷冻保存, 其余试剂 4°C保存, 有效期 6 个月, 开封后

地址: 武汉市东湖新技术开发区高科园二路盛齐安生物产业园 4 号楼

有效期为 1 个月。

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，取出混匀抽提 1 分钟，4000 转/分钟离心 10 分钟，取上清液待测。
- 2、组织样本：**准确称取组织重，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，取出混匀抽提 1 分钟，3500 转/分离心 10 分钟，取上清液待测。
- 3、普通培养细胞：**先离心处理将细胞与培养上清分离，除去培养上清，得到下层沉淀细胞（一般细胞数量达到 10^6 ），将收集好的细胞加入 300 ~ 500 μ L 冷双蒸水，置于冰水浴中匀浆破碎(取出部分测定蛋白浓度)，后将细胞悬液于沸水浴中加热 10 分钟，取出混匀抽提 1 分钟，即可用于测定。 [注]：混匀抽提 1 分钟即为漩涡混匀 1 分钟。

六、操作步骤：

	空白管	标准管	测定管	对照管
1mmol/L 标准液 (μ L)	30	30		
样本 (μ L)			30	30
试剂一：底物液 I (μ L)	100	100	100	100
试剂二：底物液 II (μ L)	200	200	200	200
试剂三：促进剂 (μ L)		30	30	
双蒸水 (μ L)	30			30
混匀，37 $^{\circ}$ C 水浴 30 分钟				
试剂四：沉淀剂 (μ L)	50	50	50	50
充分混匀后，4000rpm 离心 5 分钟，取上清液 300 μ L 进行测定				
上清液 (μ L)	300	300	300	300
试剂五：显色液 (μ L)	500	500	500	500
混匀，室温静置 2 分钟				
试剂六：终止剂 (μ L)	500	500	500	500
混匀，37 $^{\circ}$ C 静置 5-10 分钟，636nm，光径 0.5cm，双蒸水调零，分光光度计测各管吸光度值				

[注]：在比色前比色皿用自来水洗 10 余次，再用双蒸水洗 4 ~ 5 次，以免磷污染。

七、简便操作表：(如果样本量大，建议将试剂混合后再按照该表进行操作,可以节省操作时间)

1、混合试剂配制：

工作液 A:按试剂一:试剂二:试剂三=100:200:30 的比例配制，现用现配，用多少配多少。

工作液 B:按试剂一:试剂二=100:200 的比例配制，现用现配，用多少配多少。

2、混合试剂配制完全后按下表操作：

	空白管	标准管	测定管	对照管
1mmol/L 标准液 (μ L)	30	30		
样本 (μ L)			30	30
工作液 A (μ L)		330	330	
工作液 B (μ L)	300			300
双蒸水 (μ L)	30			30

混匀，37℃水浴 30 分钟				
试剂四：沉淀剂 (μL)	50	50	50	50
充分混匀后，4000rpm 离心 5 分钟，取上清液 300μL 进行测定				
样本上清液 (μL)	300	300	300	300
试剂五：显色液 (μL)	500	500	500	500
混匀，室温静置 2 分钟				
试剂六：终止剂 (μL)	500	500	500	500
混匀，37℃静置 5-10 分钟，636nm，光径 0.5cm，双蒸水调零，测各管吸光度值。				

[注]：在比色前比色皿用自来水洗 10 余次，再用双蒸水洗 4~5 次，以免磷污染。

八、计算公式及举例

1、红细胞中 ATP 含量计算公式：

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

2、组织（或普通细胞）中 ATP 含量计算公式（其一）：

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

3、组织中 ATP 含量计算公式（其二）：

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

4、普通细胞中 ATP 含量计算公式（其二）：

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

$C_{\text{标准}}$: 标准品浓度,1000μmol/L;

N : 样本测定前稀释倍数;

CHb : 血红蛋白浓度,gHb/L;

Cpr : 匀浆液蛋白浓度,gprot/L (prot 指蛋白);

W : 组织重量, g;

细胞总数 : 在细胞破碎前细胞计数的总数, 10^4 个;

$V_{\text{样总}}$: 匀浆液总体积, L。

5、计算举例：

例 1: 取制备好肠匀浆上清用双蒸水 1:3 稀释后取样 30μL 进行测定，测定 OD 值为 0.728、对照 OD 值为 0.660，标准 OD 为 0.443，标准空白 OD 值为 0.070，同时测得 10% 的匀浆上清的蛋白含量为 0.4970gprot/L，则计算结果为：

$$\begin{aligned} \text{肠ATP 含量} (\mu\text{mol/gprot}) &= \frac{0.728 - 0.660}{0.443 - 0.070} \times 1000 \times 4 \div 0.4970 \\ &= 1467.249 \mu\text{mol/gprot} \end{aligned}$$

例 2: 取制备好的细胞悬液 30μL 进行测定，测定 OD 值为 0.507、对照 OD 值为 0.481，标准 OD 为 0.422，标准空白 OD 值为 0.071，同时测得该细胞悬液蛋白含量为 1.178gprot/L，则计算结果为：

$$\begin{aligned} \text{细胞中ATP 含量} (\mu\text{mol/gprot}) &= \frac{0.507 - 0.481}{0.422 - 0.071} \times 1000 \times 1 \div 1.178 \\ &= 89.493 \mu\text{mol/gprot} \end{aligned}$$

九、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，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、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。