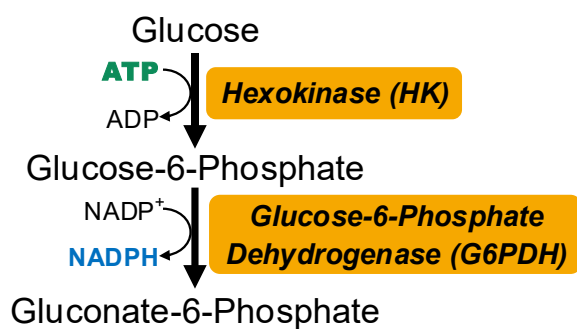




ATP 含量检测试剂盒

ATP Content Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



ATP 含量检测试剂盒

ATP Content Assay Kit

一、产品描述

腺苷三磷酸（ATP）广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，是细胞内主要的磷酸载体和生物能量通货，可作为主要供能物质参与体内的许多代谢反应。能荷是描述细胞能量代谢状态的主要参数，通过测定 ATP 含量进一步计算能荷，对于机体能量代谢状态分析具有重要意义。

己糖激酶（Hexokinase, HK）能够催化葡萄糖和 ATP 生成 6-磷酸葡萄糖，6-磷酸葡萄糖脱氢酶（Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, G6PDH）进一步催化 6-磷酸葡萄糖和 NADP^+ 生成 6-磷酸葡萄糖酸和 NADPH, NADPH 在 340 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可定量检测 ATP 的含量。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用说明及注意事项
提取液	液体 120 mL×2 瓶	4°C避光保存	-
试剂一	液体 40 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂二	粉剂×2 瓶	4°C保存	使用前每瓶加入 3.5 mL 蒸馏水充分溶解 (可超声促溶，配制后 4°C可保存 1 个月)
试剂三	液体 6 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂四	粉剂×2 支	-20°C保存	使用前每支加入 400 μL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存 2 周，避免反复冻融)
试剂五	粉剂×2 支	-20°C避光保存	使用前每支加入 1.1 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存 1 个月，避免反复冻融)
试剂六	粉剂×3 支	-20°C保存	使用前每支加入 200 μL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存 2 周，避免反复冻融)
标准品	粉剂×1 支	-20°C保存	使用前加入 900 μL 蒸馏水充分溶解 (即为 20 $\mu\text{mol/mL}$ ATP 标准液)
标准稀释液的制备（现用现配）：使用前将 20 $\mu\text{mol/mL}$ ATP 标准液使用蒸馏水稀释至 2.5、2.0、1.0、0.5、0.25、0.125 $\mu\text{mol/mL}$ 即为标准稀释液。			

自备试剂：氯仿（ CHCl_3 , MW=119.38, CAS:67-66-3）

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.

Not for further distribution without written consent. Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

序号	1	2	3	4	5	6
稀释前浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)	20	20	2.0	1.0	0.5	0.25
标准液体积 (μL)	100	100	200	200	200	200
蒸馏水体积 (μL)	700	900	200	200	200	200
稀释后浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)	2.5	2.0	1.0	0.5	0.25	0.125

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：酶标仪、96孔UV板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱、氯仿和蒸馏水。

1.待测样本的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①组织：按照组织质量 (g)：提取液体积 (mL) 为 1: (5-10) 的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴匀浆，4°C 10000 g 离心 10 min，吸取 500 μL 上清液至另一离心管中，加入 500 μL 氯仿充分振荡混匀，4°C 10000 g 离心 5 min，取上清液置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集细胞或细菌至离心管内，按照细菌或细胞数量 (10^4 个)：提取液体积 (mL) 为 (500-1000)：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴超声破碎（功率 200 W，超声 2 s，间隔 1 s，重复 20 次），4°C 10000 g 离心 10 min，吸取 500 μL 上清液至另一离心管中，加入 500 μL 氯仿充分振荡混匀，4°C 10000 g 离心 5 min，取上清液置于冰上待测。

③血清（浆）、培养液等液体样本：按照液体样本体积 (mL)：提取液体积 (mL) 为 1: (5-10) 的比例（建议吸取 0.1 mL 液体样本，加入 1 mL 提取液）处理样品，充分振荡混匀，4°C 10000 g 离心 10 min，吸取 500 μL 上清液至另一离心管中，加入 500 μL 氯仿充分振荡混匀，4°C 10000 g 离心 5 min，取上清液置于冰上待测。

2.测定步骤

①酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 340 nm。

②试剂四应用液的制备（现用现配）：根据使用量按试剂四：蒸馏水=1:9 的体积比配制。

③试剂六应用液的制备（现用现配）：根据使用量按试剂六：蒸馏水=1:14 的体积比配制。

④检测工作液的制备（现用现配）：根据使用量按试剂二：试剂三：试剂四应用液：试剂五：试剂六应用液=10:10:1:4:1 的体积比配制，使用前置于 25°C 预热 10 min 以上。

⑤在 96 孔 UV 板中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)	标准组 (μL)
待测样本	20	-
标准稀释液	-	20
试剂一	130	130
检测工作液	50	50

吸光值测定：①充分混匀并立即开始计时，测定 10 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A1 测定和 A1 标准；②准确反应 180 s，测定 190 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A2 测定和 A2 标准；③计算 ΔA 测定=A2 测定-A1 测定， ΔA 标准=A2 标准-A1 标准。

标准曲线的建立：以 2.5、2.0、1.0、0.5、0.25、0.125 $\mu\text{mol/mL}$ 为横坐标 (x)，以其对应的 ΔA 标准为纵坐标 (y)，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 测定带入公式中得到 x ($\mu\text{mol/mL}$)。

3. ATP 含量计算

①按组织蛋白浓度计算

$$\text{ATP 含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) = \frac{x \times V_{\text{提}}}{C_{\text{pr}} \times V_{\text{提}}} = \frac{x}{C_{\text{pr}}}$$

②按组织样本质量计算

$$\text{ATP 含量 } (\mu\text{mol/g}) = \frac{x \times V_{\text{提}}}{W} = \frac{x}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

$$\text{ATP 含量 } (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = \frac{x \times V_{\text{提}}}{\text{细菌或细胞数量}} = \frac{x}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④按液体样本体积计算

$$\text{ATP 含量 } (\mu\text{mol/mL}) = \frac{x \times (V_{\text{提}} + V_{\text{液}})}{V_{\text{液}}} = 11 \times x$$

注释：V 提：提取过程中加入提取液的体积，1 mL；V 液：提取过程中加入液体样本的体积，0.1 mL；C_{pr}：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细胞或细菌总数：以万计，若 500 万细菌或细胞则代入 500 即可。

四、注意事项

- ①试剂四和试剂六配制后有效期较短，为便于试验安排，附赠一支试剂四作为备用，每支均可完成至少 200 个样本的检测；附赠一支试剂六作为备用，每支均可完成至少 100 个样本的检测；
- ②提取过程应严格在冰浴条件下进行；
- ③测定过程中试剂四应用液、试剂六应用液和待测样本应置于冰上放置，以免变性和失活；
- ④提取过程中第一次离心后的上清液若为浑浊属于正常现象，不影响检测结果；
- ⑤提取液出现晶体析出属于正常现象，50-60℃水浴加热至完全溶解，冷却至室温后使用即可；
- ⑥准确在 10 s 和 190 s 处完成吸光值测定，以确保实验结果的准确性和重复性；若使用 96 孔 UV 板测定应使用多道移液器且分批进行测定，以确保组间反应时间一致；
- ⑦若 A2 测定超出标准吸光值线性范围：高于最高值建议将待测样本使用蒸馏水适当稀释后再进行测定，低于最低值建议制备更高浓度的样本后再进行测定，计算时相应修改；
- ⑧若吸光值超过 3，建议检查 96 孔板是否为 96 孔 UV 板，96 孔板会因材质问题造成吸光值接近设备量程；
- ⑨提取液中含有蛋白沉淀组分，待测样本不能直接用于蛋白含量测定，若使用蛋白浓度计算 ATP 含量，则需要另取样本使用 PBS 或生理盐水按照相同步骤制备为待测样本，再进行蛋白浓度测定；
- ⑩为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

Notes:

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

