



## ATP 含量检测实验报告

### 一、实验器材及试剂

#### 1、实验器材

名称	厂家	型号
立式冷藏柜	海尔	SC-332
台式高速冷冻离心机	湖南恒诺仪器设备有限公司	2-16R
超净工作台	苏净安泰	SW-CJ-1FD
CO2 细胞培养箱	Thermo	4131
倒置荧光显微镜	徕卡	DMi8

#### 2、主要实验试剂及耗材

耗材	厂家	货号
1.5 ml 离心管	安徽科兔生物科技有限公司	KTL-15-W
2 ml 研磨管	安徽科兔生物科技有限公司	KTL-20-W
10 $\mu$ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-10
100 $\mu$ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-100
200 $\mu$ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-200
1000 $\mu$ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-1000
5000 $\mu$ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-5000
T25	安徽科兔生物科技有限公司	KTP-25-T
96 孔板	安徽科兔生物科技有限公司	KTB-96
胰酶	安徽科兔生物科技有限公司	RG-CE-18
PBS 缓冲液	安徽科兔生物科技有限公司	RG-RT-01
DMEM 培养基	安徽科兔生物科技有限公司	RG-CE-2
血清	安徽科兔生物科技有限公司	CG-SR-02
ATP 检测试剂盒	碧云天	S0026

### 二、实验步骤



- 1、细胞准备：**选择状态良好、处于对数生长期的细胞进行实验。实验前观察细胞形态，确认细胞无污染、无明显死亡或大量漂浮细胞。
- 2、细胞接种与处理：**将细胞按合适密度接种于 6 孔板、12 孔板、24 孔板或 96 孔板中。待细胞贴壁并生长稳定后，根据实验分组进行相应处理。处理结束后，准备进行 ATP 含量检测。若使用 96 孔板直接检测，应尽量保证各孔细胞数量一致；若使用 6 孔板或培养皿检测，可收集细胞裂解液后统一上机检测。
- 3、配制 ATP 标准品：**按照 ATP 检测试剂盒说明书配制 ATP 标准品，并进行梯度稀释，建立标准曲线。
- 4、药物或处理因素干预：**弃去细胞培养基，用 PBS 轻轻清洗细胞 1-2 次，去除残留培养基和血清。加入适量 ATP 裂解液，充分覆盖细胞。冰上裂解数分钟后，用移液器轻轻吹打，使细胞充分裂解。对于贴壁细胞，可直接在孔内加入裂解液；对于悬浮细胞，应收集细胞后离心，弃上清，再加入裂解液重悬裂解。
- 5、收集细胞裂解液：**裂解完成后，将裂解液转移至离心管中，低温离心去除细胞碎片。收集上清作为 ATP 检测样本。若样本不能立即检测，应根据试剂盒说明进行低温保存，但应尽量避免反复冻融，因为 ATP 容易降解。
- 6、加入检测试剂：**按照试剂盒说明书，在白色不透明 96 孔板或适用于发光检测的检测板中加入 ATP 检测试剂。随后加入标准品或样本裂解液，轻轻混匀，避免产生大量气泡。
- 7、发光值检测：**使用多功能酶标仪或发光检测仪读取发光信号值。检测时应选择发光检测模式，一般不需要设置激发光和发射光波长。记录各孔相对发光单位，通常表示为 RLU, relative light unit。
- 8、蛋白定量或细胞数归一化：**为减少不同孔细胞数量差异对 ATP 结果的影响，建议对 ATP 检测结果进行归一化处理。按蛋白浓度归一化，ATP 含量表示为 nmol/mg protein 或  $\mu\text{mol/g protein}$ 。
- 9、数据计算：**根据 ATP 标准曲线计算样本 ATP 浓度，再结合样本体积、蛋白浓度或细胞数量计算 ATP 含量。常用表达方式包括： $\text{ATP 含量} = \text{样本 ATP 浓度} \times \text{样本体积} / \text{蛋白含量}$ 。

### 三、结果判读：

- 1、正常 ATP 水平：**若对照组 ATP 含量稳定、组内重复性较好，说明细胞状态良好，检测体系稳定，可用于组间比较。可表述为：结果显示，对照组细胞 ATP 含量维持在稳定水平，提示细胞能量代谢状态良好。



#### 四、注意事项：

- 1、**细胞数量要一致：**ATP 含量与细胞数量密切相关。实验中各组初始接种量应尽量一致，检测时应结合蛋白浓度、细胞数或 DNA 含量进行归一化。
- 2、**细胞状态要稳定：**细胞状态差、污染、过度融合或大量死亡都会影响 ATP 水平。实验前应保证细胞处于稳定生长期。
- 3、**ATP 易降解，操作要快速：**ATP 在样本中不稳定，裂解和检测过程应尽量快速完成。样本应置于冰上操作，避免长时间室温放置。