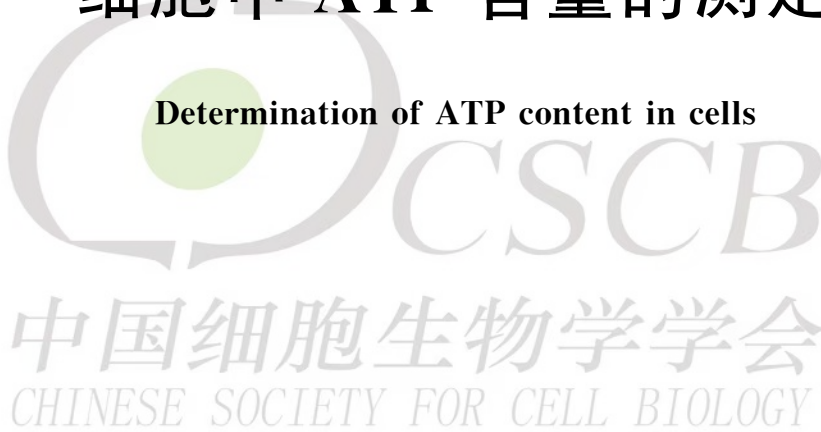


团 体 标 准

T/CSCB 0018—2024

细胞中 ATP 含量的测定

Determination of ATP content in cells



2024-10-28 发布

2024-12-31 实施

中国细胞生物学学会 发 布
中 国 标 准 出 版 社 出 版

目 次

前言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义、缩略语..... 1

4 高效液相色谱法 1

 4.1 原理 1

 4.2 试剂和溶液 2

 4.3 仪器设备 2

 4.4 样本制备与前处理 2

 4.5 样本分析 3

 4.6 结果计算 3

 4.7 精密度 3

5 生物发光法 4

 5.1 原理 4

 5.2 试剂和溶液 4

 5.3 仪器设备 4

 5.4 样本制备与前处理 4

 5.5 样本分析 5

 5.6 结果计算 5

 5.7 精密度 5

附录 A（资料性） 细胞中 ATP 含量的高效液相色谱法分析谱图..... 6

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国细胞生物学学会标准工作委员会提出。

本文件由中国细胞生物学学会归口。

本文件起草单位：中国计量科学研究院、中国科学院动物研究所、清华大学、北京泽辉辰星生物科技有限公司、普洛麦格(北京)生物技术有限公司、北京工商大学、北京干细胞与再生医学研究院、苏州大学、深圳华大生命科学研究院(国家基因库)、深圳华汉基因生命科技有限公司、安徽中盛溯源生物科技有限公司、复旦大学附属肿瘤医院、中国标准化研究院、中国食品药品检定研究院、中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所)、中山大学、中国医学科学院北京协和医院、广东省中医院(广州中医药大学第二附属医院)、中国合格评定国家认可中心、生物芯片上海国家工程研究中心。

本文件主要起草人：傅博强、黄文锋、刘瑛颖、王磊、刘媛、周琪、郝捷、赵同标、曹佳妮、段文娟、马爱进、赵红玲、牛帅帅、胡士军、李启沅、张勇、彭耀进、于晓游、俞君英、王晶、魏军、张愚、华国强、刘欣、王长林、纳涛、周家喜、项鹏、吴志宏、陈曲波、翟培军、郜恒骏。



细胞中 ATP 含量的测定

1 范围

本文件描述了细胞中 ATP 含量测定的高效液相色谱法和生物发光法,包括试剂、仪器设备、样本前处理、测定步骤、数据处理。

本文件适用于哺乳动物细胞中 ATP 含量的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义、缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

5'-三磷酸腺苷 **adenosine 5'-triphosphate; ATP**

由腺苷和三个磷酸基团连接而成的化合物,含有三个高能磷酸键,水解时释放出高能量,是生物体内最直接的能量来源。

3.1.2

5'-三磷酸腺苷生物发光 **ATP bioluminescence**

细胞经化学试剂处理后释放的 5'-三磷酸腺苷(ATP)与萤光素和萤光素酶反应产生的荧光。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ATP:5'-三磷酸腺苷(Adenosine 5'-triphosphate)

EDTA:乙二胺四乙酸(Ethylene Diamine Tetraacetic Acid)

HPLC:高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography)

PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffer Solution)

4 高效液相色谱法

4.1 原理

采用高氯酸水溶液超声裂解细胞,释放出活细胞中的 ATP。对中和后的提取液中的 ATP,采用高效液相色谱-紫外法检测,ATP 纯度标准物质外标法定量,得到群体细胞中的 ATP 总量。根据所取样

本中的细胞总数,计算得到样本细胞群中单个细胞含有的 ATP 的物质的量。

4.2 试剂和溶液

除非另有说明,本方法所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.2.1 5'-三磷酸腺苷(ATP)二钠盐有证标准物质:扣除结晶水和吸附水,以 5'-三磷酸腺苷二钠盐计的纯度 $\geq 92\%$ 。

4.2.2 胰蛋白酶消解液(Trypsin-EDTA)。

4.2.3 高氯酸:分析纯,质量分数 71%,浓度 12.44 mol/L。

4.2.4 磷酸二氢钾:纯度 99%以上。

4.2.5 磷酸氢二钾:纯度 99%以上。

4.2.6 碳酸钾:纯度 99%以上。

4.2.7 PBS:pH=7.4。

4.2.8 流动相:0.05 mol/L KH_2PO_4 和 0.05 mol/L K_2HPO_4 (体积比为 1:1)的缓冲液,pH=6.8。

4.2.9 ATP 标准储备液(1.0×10^4 $\mu\text{mol/L}$):准确称取 ATP 标准物质约 5.5 mg,用移液器加入 1.0 mL 水,涡旋溶解;4 $^\circ\text{C}$ 保存,在保证无微生物污染的情况下,可稳定保存 1 个月;-20 $^\circ\text{C}$ 下可稳定保存 1 年。

4.2.10 ATP 标准系列工作液:取 ATP 标准储备液,用流动相(4.2.8)稀释,依次得到 100 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 、2 $\mu\text{mol/L}$ 的 ATP 标准系列工作液。

4.3 仪器设备

4.3.1 高效液相色谱仪:配备紫外检测器。

4.3.2 涡旋振荡器。

4.3.3 pH 计:分度值 0.01。

4.3.4 电子天平:分度值 0.1 mg。

4.3.5 离心机:4 $^\circ\text{C}$,离心力 $\geq 14\ 000g$ 。

4.3.6 超声波振荡器。

4.3.7 移液器:10 μL ~100 μL ,100 μL ~1 000 μL 。

4.3.8 细胞计数仪。

4.4 样本制备与前处理

4.4.1 细胞样本的采集

4.4.1.1 悬浮细胞

取悬浮培养细胞(含 $2 \times 10^7 \sim 4 \times 10^7$ 细胞)于离心管中,4 $^\circ\text{C}$,460g 离心 2 min,弃去上清液。加 1 mL 预冷的 PBS,4 $^\circ\text{C}$,460g 离心 2 min 洗涤细胞,弃去上清液。加 1 mL 预冷的 PBS,重悬。从其中平行取 3 份样本至 1.5 mL 离心管中,300 μL /管。460g 离心 2 min,弃去上清液,用于后续 ATP 的提取。可放在液氮中速冻备用。

剩余的约 100 μL 细胞悬液,用细胞计数仪测量总细胞浓度。

4.4.1.2 贴壁细胞

将贴壁生长细胞的培养基吸取弃掉,然后使用预冷的 PBS 冲洗细胞培养瓶,加 1 mL 胰蛋白酶消解液在细胞培养箱(37 $^\circ\text{C}$,5% CO_2)孵育 3 min,当细胞形态变圆,有脱落现象发生,立即加入 2 mL 新培养基中止消化。然后按 4.4.1.1 中的方法进行处理。

4.4.2 细胞内 ATP 的提取

对 4.4.1 中离心得到细胞沉淀,每管含 $6 \times 10^6 \sim 1.2 \times 10^7$ 细胞,各加 500 μL 高氯酸水溶液(1 mol/L),冰浴中超声提取 2 min,高速涡旋 2 min。13 500g 离心(4 $^{\circ}\text{C}$)5 min,取出上清液。250 μL 碳酸钾水溶液(2 mol/L)中和,13 500g 离心(4 $^{\circ}\text{C}$)5 min。取上清,分别加入到 3 个离心管中。分别补水至约 1 mL (根据溶液质量和密度计算体积)。0.22 μm 水系滤膜过滤,滤液即测或 -70°C 以下保存待测。

4.5 样本分析

4.5.1 液相色谱分析条件

液相色谱柱:水系 C18 色谱柱(3 mm $\times$ 150 mm,2.7 μm)。

流动相:0.05 mol/L KH_2PO_4 和 0.05 mol/L K_2HPO_4 (体积比为 1 : 1)的缓冲液,pH=6.8。

柱温:25 $^{\circ}\text{C}$ 。

流速:0.5 mL/min。

检测波长:254 nm。

进样量:1 μL 。

4.5.2 ATP 标准工作曲线的绘制

采用外标法进行定量。将浓度分别为 2 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 的 ATP 标准系列工作液分别注入高效液相色谱仪中,测定 ATP 的峰面积。以峰面积为纵坐标,以 ATP 标准系列工作液浓度为横坐标绘制标准曲线,拟合线性回归方程。要求线性相关系数 r 大于 0.995。

4.5.3 细胞样品溶液中 ATP 含量的 HPLC 分析

在相同色谱条件下,取 4.4.2 中处理得到的胞内 ATP 的提取液,按 4.5.1 中的条件,进行高效液相色谱分析。

ATP 标准溶液和细胞内 ATP 的高效液相色谱图见附录 A。

4.6 结果计算

利用由 4.5.2 中测定的数据绘制 ATP 标准曲线,得到线性回归方程,根据细胞样品中 ATP 的峰面积,外标法定量,计算得到被测细胞群的 ATP 含量总量。

对每份样本中的总细胞数,用细胞计数仪测得细胞浓度后计算得到。

进一步计算得到样本中单个细胞中 ATP 的物质的量的平均值,按公式(1)计算:

$$n = \frac{c_i \times V_1 / 1\,000}{N} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

n ——样本中单个细胞中 ATP 的物质的量的平均值,单位为微摩尔(μmol);

c_i ——细胞内 ATP 提取液中 ATP 的浓度,单位为微摩尔每升($\mu\text{mol/L}$);

V_1 ——细胞内 ATP 提取液的体积,单位为毫升(mL);

N ——样本中细胞总数。

4.7 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不应超过算术平均值的 20%。

5 生物发光法

5.1 原理

采用细胞裂解剂裂解细胞,释放出活细胞中的 ATP。采用 ATP 生物发光检测试剂盒,将 ATP 提取液与含有萤光素酶和萤光素的试剂盒溶液孵育,采用管式或微孔板式发光检测仪测定产生的“辉光型”光信号强度。ATP 纯度标准物质外标法定量,得到群体细胞中的 ATP 总量。根据所取样本中的细胞总数,计算得到样本细胞群中单个细胞含有的 ATP 的物质的量。

5.2 试剂和溶液

除非另有说明,本方法所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.2.1 5'-三磷酸腺苷(ATP)二钠盐有证标准物质:扣除结晶水和吸附水,以 5'-三磷酸腺苷二钠盐计的纯度 $\geq 92\%$ 。

5.2.2 胰蛋白酶消解液(Trypsin-EDTA)。

5.2.3 PBS(pH=7.4)。

5.2.4 EDTA 水溶液(pH=6.5)。

5.2.5 细胞培养基。

5.2.6 ATP 生物发光检测试剂盒:含细胞裂解剂、发光试剂, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

5.2.7 ATP 标准储备液($1.0 \times 10^4\text{ }\mu\text{mol/L}$):准确称取 ATP 标准物质约 5.5 mg,用移液器加入 1.0 mL 不含血清的与细胞培养相同的培养基,涡旋溶解。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,在保证无微生物污染的情况下,可稳定保存 1 个月; $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下可稳定保存 1 年。

5.2.8 ATP 标准系列工作液:取 ATP 标准储备液,用细胞培养基十倍系列稀释,依次得到 1 000 nmol/L、500 nmol/L、200 nmol/L、100 nmol/L、50 nmol/L、10 nmol/L 的 ATP 标准系列工作液。

5.3 仪器设备

5.3.1 管式或微孔板式发光检测仪。

5.3.2 涡旋振荡器或定轨振荡器。

5.3.3 pH 计:分度值 0.01。

5.3.4 电子天平:分度值 0.1 mg。

5.3.5 离心机: $4\text{ }^{\circ}\text{C}$,离心力 $\geq 14\text{ }000g$ 。

5.3.6 超声波振荡器。

5.3.7 细胞培养箱: $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 。

5.3.8 移液器: $10\text{ }\mu\text{L} \sim 100\text{ }\mu\text{L}$, $100\text{ }\mu\text{L} \sim 1\text{ }000\text{ }\mu\text{L}$ 。

5.3.9 细胞计数仪。

5.3.10 不透明壁多孔板:兼容微孔板发光检测仪的 96 孔板/384 孔板/1 536 孔板。

5.4 样本制备与前处理

5.4.1 悬浮细胞

对生长在非微孔板中的悬浮细胞,取悬浮培养细胞(含 $1 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$ 细胞)于离心管中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $460g$ 离心 2 min,弃去上清液。加 1 mL 预冷的 PBS, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $460g$ 离心 2 min 洗涤细胞,弃去上清液。加 $400\text{ }\mu\text{L}$ 预冷的 PBS,重悬。从其中平行取 3 份样本至 96 孔板中, $100\text{ }\mu\text{L/孔}$ (384 孔板为 $25\text{ }\mu\text{L/孔}$, 1 536 孔板为 $4\text{ }\mu\text{L/孔}$)。 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存待测。

剩余的细胞悬液,用细胞计数仪测量总细胞浓度。

对生长在 96 孔板、384 孔板、1 536 孔板中的细胞,可不用处理,直接测定。

5.4.2 贴壁细胞

对生长在非微孔板中的贴壁细胞,将贴壁生长细胞的培养基吸取弃掉后,使用预冷的 PBS 冲洗细胞培养瓶,加 1 mL 胰蛋白酶消解液在细胞培养箱(37 ℃,5% CO₂)孵育 3 min,当细胞形态变圆,有脱落现象发生,立即加入 2 mL 新培养基中止消化。然后按 5.4.1 中的方法进行处理。

对生长在 96 孔板、384 孔板、1 536 孔板中的细胞,可不用处理,直接测定。

5.5 样本分析

5.5.1 ATP 标准溶液的生物发光分析

参照 ATP 生物发光检测试剂盒使用方法,将浓度为 1 000 nmol/L、500 nmol/L、200 nmol/L、100 nmol/L、50 nmol/L、10 nmol/L 的 ATP 标准系列工作液各取 100 μL 加入到测试管或 96 孔板中(384 孔板为 25 μL,1 536 孔板为 4 μL),每个浓度 2 个平行孔。每孔中加入等体积的 ATP 发光试剂,将测试管或多孔板在涡旋振荡器或定轨振荡器上混合 2 min 后,在室温孵育 10 min,以稳定发光信号。在管式或微孔板式发光检测仪上测定发光强度。

以发光强度为纵坐标,以 ATP 标准系列工作液浓度为横坐标绘制标准曲线,拟合线性回归方程。要求线性相关系数 r 大于 0.995。

5.5.2 细胞样本溶液中 ATP 含量的生物发光分析

对 5.4 中处理得到的待测样本,参照 ATP 生物发光检测试剂盒使用方法,每个测试管或样品孔中加入等体积的 ATP 发光试剂,将测试管或多孔板在涡旋振荡器或定轨振荡器上混合 2 min 以裂解细胞,在室温孵育 10 min,以稳定发光信号。在管式或微孔板式发光检测仪上测定发光强度。每个样品 3 个平行。

为防止 ATP 污染和降解,试验应在生物安全柜或超净台中进行操作,佩戴口罩和手套,避免接触可能受到污染的表面和设备。用 10% 的漂白剂溶液清洁手套、实验室表面和设备,拍干。尽可能使用单独包装或指定的无 ATP 移液器和移液器吸头。

5.6 结果计算

利用 5.5.1 中 ATP 标准曲线的线性回归方程,根据样本中 ATP 的发光强度,外标法定量,计算得到被测细胞群的 ATP 含量总量。

对每份样本中的总细胞数,用细胞计数仪测得细胞浓度后计算得到。

计算样本中单个细胞中 ATP 的物质的量的平均值,按公式(2)计算:

$$n = \frac{c_i \times V_1 / 1\,000\,000}{N} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

n ——样本中单个细胞中 ATP 的物质的量的平均值,单位为纳摩尔(nmol);

c_i ——细胞内 ATP 提取液中 ATP 的浓度,单位为纳摩尔每升(nmol/L);

V_1 ——细胞内 ATP 提取液的体积,单位为微升(μL);

N ——样本中细胞总数。

5.7 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不应超过算术平均值的 20%。

附 录 A

(资料性)

细胞中 ATP 含量的高效液相色谱法分析谱图

细胞中 ATP 含量的高效液相色谱法分析谱图如图 A.1 所示。

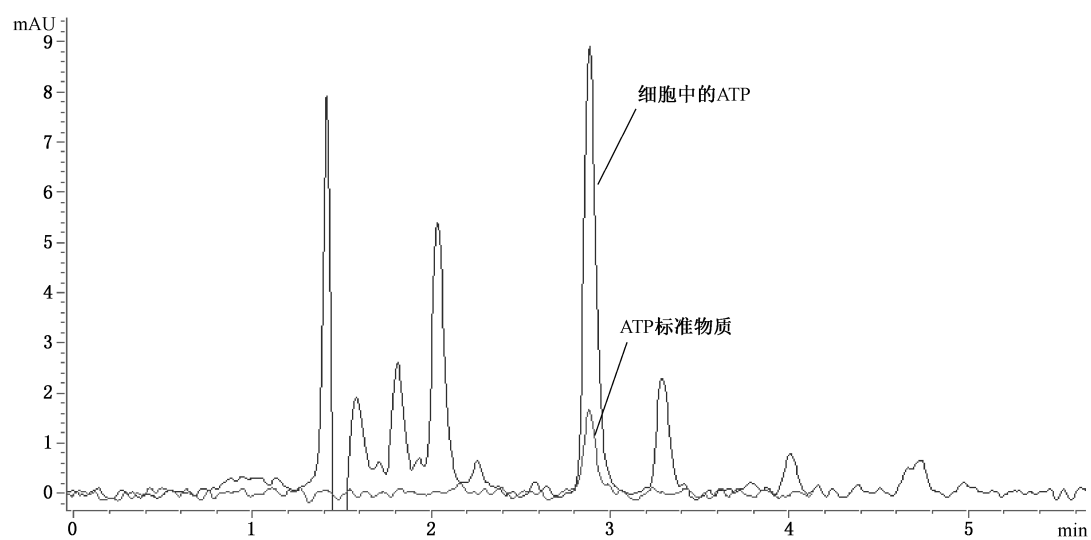


图 A.1 细胞中 ATP 与 ATP 标准物质的高效液相色谱图的叠加图

中国细胞生物学学会
CHINESE SOCIETY FOR CELL BIOLOGY