

ATP 含量（磷钼酸比色法）测定试剂盒说明书

（微板法 48 样）

一、产品简介：

三磷酸腺苷（ATP）是生物体内能量转换最基本的载体,是生物体内最直接的能量来源,测定 ATP 含量并且计算能荷,能够反映能量代谢状态。

肌酸激酶催化三磷酸腺苷（ATP）和肌酸生成磷酸肌酸,用磷钼酸比色法进行检测,经波长扫描产物在 700nm 处有最大吸收峰,进而计算得到 ATP 的含量。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使粉体落入底部,再加入 1.1mL 蒸馏水充分溶解待用;用不完的试剂分装后-20℃保存,禁止反复冻融。
试剂二	液体 6mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉剂 μg×1 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使粉体落入底部,再加入 0.55mL 蒸馏水溶解待用;用不完的试剂分装后-20℃保存,禁止反复冻融。
试剂四	粉剂 mg×1 瓶	4℃保存	用前甩几下或离心使粉体落入底部,再加入 2.86mL 水混匀,再加入 1.14mL 浓硫酸(加浓硫酸时务必缓慢加入水中,注意防护)。
试剂五	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉体 mg×1 支	-20℃保存	用前准确称取 2mg 粉体即 ATP 至一新 EP 管中,再加 1.7mL 蒸馏水溶解即 2 μmol/mL,再用水稀释一倍成 1 μmol/mL 标准品,待用(-20℃保存,一周内用完)。

【注】：全程操作需无磷环境；试剂配置最好用新的枪头和玻璃移液器等，也可以用一次性塑料器皿，避免磷污染。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、水浴锅、可调式移液枪、研钵和蒸馏水。

四、ATP 含量检测：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

1、 样本制备：

① 组织样本：

称取约 0.1g 组织加入研钵中,加入 1mL 提取液,进行匀浆,转至 EP 管中,于 95℃ 水浴中煮 5min,取出冷却至室温后于 12000rpm,室温离心 10min,上清液待测。

【注】：也可以按照组织质量(g):提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例提取。

② 细菌/真菌样本：

先收集细菌或细胞到离心管内,离心弃上清;取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液,超声波破碎细菌或细胞(冰浴,功率 200W,超声 3s,间隔 10s,重复 30 次),于 95℃ 水浴中煮 5min,取出冷却至室温后于 12000rpm,室温离心 10min,上清液待测。

【注】：也可按照细菌或细胞数量(10⁴个):提取液体积(mL)为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本：

澄清样本直接检测，若浑浊则 12000rpm，4℃离心 5min 后取上清液测定。

【注】：也可以按照血清（浆）体积（mL）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例提取。

2、上机检测：

- ① 酶标仪预热 30 min 以上，调节波长到 700nm。
- ② **反应液**配制：按照试剂四：试剂五=1：5 的比例混匀。用多少配多少的混合液。
- ③ 在 EP 管中依次加入：

试剂名称(μL)	测定管	对照管	标准管	空白管 (仅做一次)
样本	20	20		
标准液			20	
试剂一	20		20	
试剂二	50	50	50	50
试剂三	10		10	
蒸馏水		30		50
充分混匀，37℃准确水浴 30min				
反应液	180	180	180	180
混匀，37℃水浴 20min，液体全部转移至 96 孔板中，在 700nm 下 读取各管吸光值 A（每个测定管需设一个对照管）。				

【注】若 A 测定-A 对照的值小于 0.01，可增加取样质量 W（如增至 0.2g）或增加样本加样量 V1（如由 10μL 增至 50μL，其他试剂不变）；标准管仍为 20μL，其他试剂不变；则改变后的 W 和 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本鲜重计算：

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) = [\text{C 标准} \times V_{\text{标}} \times (\text{A 测定} - \text{A 对照}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白})] \div (\text{W} \times V1 \div V) \\ = (\text{A 测定} - \text{A 对照}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{W}$$

2、按细菌/细胞密度计算：

$$\text{ATP 含量}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = [\text{C 标准} \times V_{\text{标}} \times (\text{A 测定} - \text{A 对照}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白})] \div (500 \times V1 \div V) \times 10^3 \\ = 2 \times (\text{A 测定} - \text{A 对照}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白})$$

3、液体中 ATP 含量计算：

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/mL}) = [\text{C 标准} \times V_{\text{标}} \times (\text{A 测定} - \text{A 对照}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白})] \div V1 \\ = (\text{A 测定} - \text{A 对照}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白})$$

C 标准---标准液浓度，1μmol/mL；

V1---加入反应体系中样本体积，0.02mL；

W---样本质量，g；

V---加入提取液体积，1mL；

V_标---标准品加样体积，0.02mL；

500---细胞或细菌总数，万。