

## ATP 含量（磷钼酸比色法）测定试剂盒说明书

（微板法 96 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	提取液 A 50mL×1 瓶 提取液 B 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×2 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使粉体落入底部，每支再加入 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 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉剂 μg×2 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使粉体落入底部，每支再加入 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×2 瓶	4℃保存	临用甩几下使粉剂落入底部，每瓶再依次加入 2.86mL 水混匀，最后加 1.14mL 浓硫酸（ <b>加浓硫酸时务必小心，逐滴缓慢加入水中，注意防护。</b> ）
试剂五	液体 40mL×1 瓶	4℃保存	
标准液	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 2μmol/mL，再用水稀释一倍成 1μmol/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、**浓硫酸**、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 0.5mL 提取液 A 进行匀浆，转至 EP 管中，于 12000rpm，室温离心 10min，取出 250μL 上清液至一新 EP 管中，再加入适量提取液 B 调 PH 至中性（用 PH 试纸测量，PH 在 6.5-8 之间均可）。再加蒸馏水定容至 0.5mL，该液体待测备用。

**【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 万细菌或细胞至研钵中，加 0.5mL 提取液 A 进行匀浆，低温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 12000rpm, 室温离心 10min, 取出 250 $\mu$ L 上清液至一新 EP 管中, 再加入适量提取液 B 调 PH 至中性 (用 PH 试纸测量, PH 在 6.5-8 之间均可)。再加蒸馏水定容至 0.5mL, 该液体待测备用。

③ 液体样本:

澄清样本直接检测, 若浑浊则 12000rpm, 4 $^{\circ}$ C 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( $\mu$ L)	测定管	对照管	标准管 (仅做一次)	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 $^{\circ}$ C 准确水浴 30min				
反应液	180	180	180	180
混匀, 37 $^{\circ}$ C 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 20 $\mu$ L 增至 50 $\mu$ L, 则试剂二相应减少); 标准管仍为 20 $\mu$ L, 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:

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

2、按细菌/细胞密度计算:

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

3、液体中 ATP 含量计算:

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

C 标准---标准液浓度, 1 $\mu$ mol/mL;

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入反应体系中样本体积, 0.02mL;

V<sub>标</sub>---标准品加样体积, 0.02mL;

W---样本质量, g;

500---细胞或细菌总数, 万。