

ATP 含量（磷钼酸比色法）测定试剂盒说明书

（分光法 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×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 1.5mL 蒸馏水充分溶解待用；用不完试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。
试剂二	液体 12mL×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，再加入 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。
试剂四	粉剂 mg×2 瓶	4℃保存	用前甩几下使粉剂落入底部，每瓶依次加入 4.3mL 水，再加 1.7mL 浓硫酸（ 加浓硫酸时务必小心，逐滴缓慢加入水中，注意防护 ）。
试剂五	液体 60mL×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：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、水浴锅、可调式移液枪、研钵。

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 可见分光光度计预热 30 min 以上，调节波长到 700nm，蒸馏水调零。
- 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	50	50		
标准液			50	
试剂一	50		50	
试剂二	100	100	100	100
试剂三	30		30	
蒸馏水		80		130
充分混匀，37℃准确水浴 30min				
反应液	480	480	480	480
混匀，37℃水浴 20min，液体全部转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）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 50μL 增至 100μL，则试剂二相应减少）；标准管仍为 50μL，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：

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

2、按细菌/细胞密度计算：

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

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，0.05mL；

W---样本质量，g；

V---加入提取液体积，1mL；

V_标---标准品加样体积，0.05mL；

500---细胞或细菌总数，万。