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	液体 100mL×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（**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 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、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（10^4 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 20μL 增至 50μL，则试剂二相应减少）；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：

ATP 含量(μmol/g 鲜重)=[C 标准×$V_{标}$×(A 测定-A 对照)÷(A 标准-A 空白)]÷(W×V1÷V)

=(A 测定-A 对照)÷(A 标准-A 空白)÷W

2、按细菌/细胞密度计算：

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

=2×(A 测定-A 对照)÷(A 标准-A 空白)

3、液体中 ATP 含量计算：

ATP 含量(μmol/mL)=[C 标准×$V_{标}$×(A 测定-A 对照)÷(A 标准-A 空白)]÷V1

=(A 测定-A 对照)÷(A 标准-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。