

ATP 含量（磷钼酸比色法）测定试剂盒说明书

（货号：BP10441W 微板法 96 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
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 2 支	-20℃ 保存	每支： 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 1.1mL 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 10mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂三	粉剂 2 支	-20℃ 保存	每支： 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 0.55mL 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 2 瓶	4℃ 避光保存	每瓶： 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 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）； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂五	液体 40mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准液	粉体 1 支	-20℃ 保存	1. 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 μ mol/L/mL； 2. 再用水稀释一倍成 1 μ mol/L/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、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、**浓硫酸**、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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 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。

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、检测步骤：

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：

试剂组分(μL)	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℃ 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：

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

2、按细菌/细胞密度计算：

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

3、液体中 ATP 含量计算：

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

4、按蛋白浓度计算：

$$\text{ATP 含量}(\mu\text{mol/mg prot}) = \frac{[C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}} \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})] \div (C_{\text{pr}} \times V1 \div V)}{(A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}}}$$

C 标准---标准液浓度, $1\mu\text{mol/mL}$; V---加入提取液体积, 1mL ;
V1---加入反应体系中样本体积, 0.02mL ; V_标---标准品加样体积, 0.02mL ;
W---样本质量, g; 500---细胞或细菌总数, 万;
Cpr---蛋白浓度 (mg/mL) ; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。