

## 土壤 ATP 含量（磷钼酸比色法）测定试剂盒说明书

（货号：ADS-F-TR072 分光法 24 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 15mL×1 瓶 提取液 B 3mL×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 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 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 1 瓶	4℃避光保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 4.3mL 水，再加 1.7mL 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> ）； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂五	液体 30mL×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 2μmol/mL； 2. 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、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）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、**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：

称取约 0.1g 土壤加入 EP 管中，加 0.5mL 提取液 A 进行匀浆，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、检测步骤：

- 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	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°C准确水浴 30min				
反应液	480	480	480	480
混匀，37°C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，可增加土样质量 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：

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

C 标准---标准液浓度，1μmol/mL；

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入反应体系中样本体积，0.05mL；

V<sub>标</sub>---标准品加样体积，0.05mL；

W---样本质量，g。