

ATP 含量检测试剂盒(WST 显色法)

中文名称：ATP 含量检测试剂盒(WST 显色法)

英文名称：ATP Content Assay Kit(WST-1 Method)

产品包装：盒装

产品规格：50T/48S

储存条件：-20℃

检测方法：可见分光光度法

有效期：6个月

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 45 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 8 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	粉剂×3 支	-20℃保存
试剂五	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂六	粉剂×3 支	-20℃保存
试剂七	液体 12 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	-20℃保存

溶液的配制：

1. 提取液：低温条件下，可能有结晶析出，放于 60℃水浴加热溶解即可，不影响使用；
2. 试剂二：临用前加入 7 mL 蒸馏水充分溶解，可加热促进溶解，用不完的试剂 2-8℃

保存 4 周；

3. 试剂四：临用前取 1 支加入 0.2mL 蒸馏水溶解，用不完的试剂-20℃分装保存 2 周，避免反复冻融；

4. 试剂五：临用前加入 3.2 mL 蒸馏水充分溶解，用不完的试剂-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融；

5. 试剂六：临用前取 1 支加入 0.25 mL 蒸馏水备用，用不完的试剂-20℃分装保存 2 周，避免反复冻融；

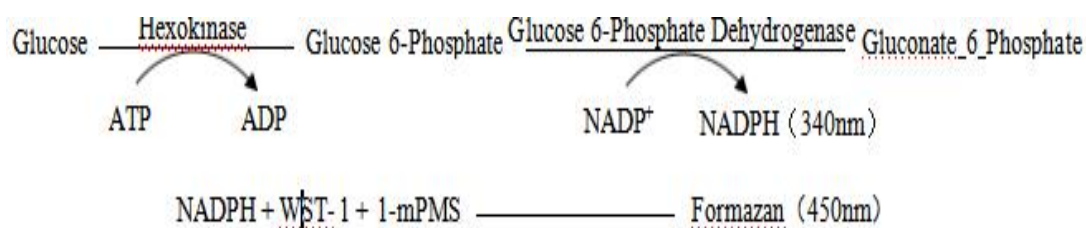
6. 标准品：5 mg ATP。临用前加入 0.826 mL 蒸馏水配成 10 μ mol/mL 的 ATP 标准溶液，用不完的试剂-20℃ 分装保存 4 周，避免反复冻融；

7. 0.3125 μ mol/mL 标准溶液的配制：临用前吸取 20 μ L 10 μ mol/mL 的 ATP 标准溶液和 620 μ L 蒸馏水混合配制成 0.3125 μ mol/mL 标准溶液，用于标准管的测定；

8. 工作液的配制：临用前请按试剂二：试剂三：试剂四：试剂五：试剂六=1mL：1mL：0.1mL：0.4mL：0.1mL 的比例配制（2.6mL，约 10T 的量），现配现用。

产品简介：TP 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，是生物能量通货，能荷是描述细胞能量代谢状态的主要参数。测定 ATP 含量并且计算能荷，能够反映能量代谢状态。

HK 催化葡萄糖和 ATP 合成 6-磷酸葡萄糖，6-磷酸葡萄糖脱氢酶进一步催化 6-磷酸葡萄糖脱氢生成 NADPH，WST-1 可与 NADPH 反应，产生水溶性 formazan，在 450nm 下有特征吸收峰。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范

围内建议稀释或者 增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计、水浴锅/恒温培养箱、低温离心机、可调式移液枪、1mL 玻璃比色皿、研钵/匀浆器/超声波 细胞破碎仪、蒸馏水、冰和氯仿。

操作步骤:

一、样本处理(可适当调整待测样本量)

1、血清(浆)中 ATP 的提取: 按照血清(浆)体积 (mL): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议取约 0.1mL 血清(浆), 加入 1mL 提取液) 混合, 充分震荡, 10000g, 4℃离心 10min; 取上清液至另一 EP 管中, 加入 500μL 的氯仿充分震荡混匀, 10000g 4℃离心 3min, 取上清, 置冰上待测 (不可用于蛋白质含量测定)。

2、组织中 ATP 的提取: 按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液), 进行冰浴匀浆, 10000g 4℃离心 10min, 取上清至另一 EP 管中, 加入 500μL 的氯仿充分震荡混匀, 10000g 4℃离心 3min, 取上清, 置冰上待测 (不可用于蛋白质含量测定)。

3、细胞或细菌中 ATP 的提取: 先收集细胞或细菌到离心管内, 弃上清, 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(建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液), 超声波破碎 (冰浴, 功率 200W, 超声 2s, 停 1s, 总时间 1min), 10000g 4℃离心 10min; 取上清液至另一 EP 管中, 加入 500μL 的氯仿充分震荡混匀, 10000g 4℃离心 3min, 取上清, 置冰上待测(不可用于蛋白质含量测定)。

注: 以上提取过程严格控制在冰浴条件下进行。

二、测定步骤

1、可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长到 450nm, 蒸馏水调零。

2、试剂一置于 37℃水浴锅/恒温培养箱中预热 15min 以上。

3、操作表：(按下表在 1.5mLEP 管中加入相应试剂)

试剂名称(μL)	测定管	标准管	空白管
样本	100	-	-
标准溶液	-	100	-
蒸馏水	-	-	100
试剂一	650	650	650
工作液	250	250	250
混匀，置于 37℃水浴锅/恒温培养箱中培养 1h			
试剂七	150	150	150

充分混匀，于 1mL 玻璃比色皿测定 450nm 处的吸光值，记为 A 测定、A 标准、A 空白，计算 ΔA 测定=A 测定-A 空白， ΔA 标准=A 标准-A 空白(空白管和标准管只需做 1-2 次)。

三、ATP 含量计算

1. 血清（浆）中 ATP 含量计算

$$\begin{aligned} \text{ATP 含量}(\mu\text{mol/mL}) &= C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times (V_{\text{提取}} + V_{\text{血清(浆)}}) \div V_{\text{血清(浆)}} \\ &= 3.4375 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \end{aligned}$$

2. 按样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{ATP 含量}(\mu\text{mol/g 质量}) &= C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{提取}} \div W = 0.3125 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \\ &\Delta A_{\text{标准}} \div W \end{aligned}$$

3. 按蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{ATP 含量}(\mu\text{mol/mg prot}) &= C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) \\ &= 0.3125 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

4. 按细菌或细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{ATP 含量}(\mu\text{mol}/10^4\text{cell}) &= C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{提取}} \div N = 0.3125 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \\ &\Delta A_{\text{标准}} \div N \end{aligned}$$

C 标准：标准溶液浓度， $0.3125\mu\text{mol/mL}$ ；V 提取：加入的提取液体积， 1mL ；V 血清（浆）：血清（浆）体积， 0.1mL ；V 样本：反应体系中加入的样本体积， 0.1mL ；W：样本质量，g；Cpr：样本蛋白浓度， mg/mL ；N：细胞或细菌总数，按 10^4 个。

注意事项：

- 1、加入提取液离心后的上清若为浑浊为正常现象。
- 2、如果 ΔA 测定 >1.5 ，建议将样本用蒸馏水稀释后进行测定。注意计算公式中乘以稀释倍数；如果吸光值过低 或接近空白，建议统一放置于 37°C 水浴锅/恒温培养箱中培养 2h 或更长时间后再次测定，也可以加大样本量后进行测定，注意同步修改计算公式。
- 3、提取液中含蛋白变性成分，若按蛋白浓度计算需要另取样本重新计算。

实验实例：

- 1、取 0.108g 小鼠脑加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆， 10000g 4°C 离心 10min ，取上清至另一 EP 管中，加入 $500\mu\text{L}$ 的氯仿充分震荡混匀， 10000g 4°C 离心 3min ，取上清，置冰上按照测定步骤操作，使用 1mL 玻璃比色皿测得计算 ΔA 测定 $=0.283-0.154=0.129$ ， ΔA 标准 $=A$ 标准 $-A$ 空白 $=0.569-0.154=0.415$ ，按样本质量计算含量得：ATP 含量($\mu\text{mol/g}$ 质量) $=0.3125\times\Delta A$ 测定 $\div\Delta A$ 标准 $\div W=0.899\mu\text{mol/g}$ 质量。
- 2、取 0.111g 绿萝叶片加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆， 10000g 4°C 离心 10min ，取上清至另一 EP 管中，加入 $500\mu\text{L}$ 的氯仿充分震荡混匀， 10000g 4°C 离心 3min ，取上清，置冰上按照测定步骤操作，使用 1mL 玻璃比色皿测得计算 ΔA 测定 $=0.387-0.154=0.233$ ， ΔA 标准 $=A$ 标准 $-A$ 空白 $=0.569-0.154=0.415$ ，按样本质量计算含量得：ATP 含量($\mu\text{mol/g}$ 质量) $=0.3125\times\Delta A$ 测定 $\div\Delta A$ 标准 $\div W=1.58\mu\text{mol/g}$ 质量。