



## 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：100T/96S

储存条件：-20℃

检测方法：微量法

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 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 20mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 4mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂五	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂六	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂七	液体 4 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 3.5 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 0.2 mL 蒸馏水溶解, 用不完的试剂-20°C分装保存 2 周, 避免反复冻融; 为延 长试剂盒使用时间故多提供一支。

4 、试剂五: 临用前加入 1 mL 蒸馏水充分溶解, 用不完的试剂-20°C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°C分装保存 2 周, 避免反复冻融; 为延 长试剂盒使用时间故多提供一支。

6 、标准品: 5 mg ATP 。临用前加入 0.826 mL 蒸馏水配成 10  $\mu\text{mol/mL}$  的 ATP 标准溶液, 用不完的试剂-20°C 分装保存 4 周, 避免反复冻融。

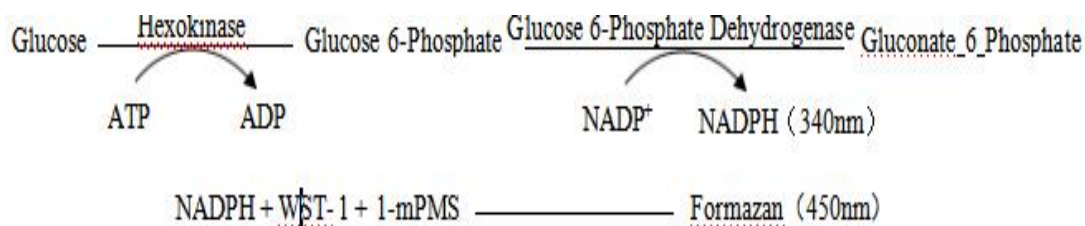
7 、0.4 $\mu\text{mol/mL}$  标准溶液的配制: 临用前吸取 20 $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{mol/mL}$  的 ATP 标准溶液和 480 $\mu\text{L}$  蒸馏水混合配制成 0.4 $\mu\text{mol/mL}$  标准溶液, 用于标准管的测定。

8 、工作液的配制: 临用前按试剂二(mL): 试剂三(mL): 试剂四(mL): 试剂五(mL): 试剂六(mL)=0.2mL: 0.2mL: 0.02mL: 0.08mL: 0.02mL 的比例配制 (0.52mL, 约 10T 的量), 现配现用。

#### 产品简介 :

ATP 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、微量玻璃比色皿/ 96 孔板、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<sup>4</sup> 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°C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°C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/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长到 450nm, 分光光度计用蒸馏水调零。
- 2、试剂一置于 37°C水浴锅/恒温培养箱中预热 15min 以上。
- 3、(按下表在 1.5mLEP 管或 96 孔板中加入相应试剂)

试剂名称(μL)	测定管	标准管	空白管
样本	20	-	-
标准溶液	-	20	-
蒸馏水	-	-	20
试剂一	130	130	130
工作液	50	50	50
混匀, 置于 37°C水浴锅/恒温培养箱中培养 1h			
试剂七	30	30	30

充分混匀, 吸取 200μL 反应液于微量玻璃比色皿或者 96 孔板中测定 450nm 处的吸光值, 记为 A 测定、A 标准、A 空白, 计算  $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{空白}$ ,  $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白}$  (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

ATP 含量(μmol/mL) =  $C_{标准} \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \times (V_{提取} + V_{血清(浆)}) \div V_{血清(浆)}$   
 $= 4.4 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准}$



## 2. 按样本质量计算

ATP 含量( $\mu\text{mol/g}$  质量) =  $C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{提取}} \div W = 0.4 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W$

## 3. 按蛋白浓度计算:

ATP 含量( $\mu\text{mol/mg prot}$ ) =  $C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) = 0.4 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$

## 4. 按细菌或细胞数量计算

ATP 含量( $\mu\text{mol}/10^4\text{cell}$ ) =  $C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{提取}} \div N = 0.4 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div N$

C 标准: 标准溶液浓度,  $0.4\mu\text{mol/mL}$ ; V 提取: 加入的提取液体积,  $1\text{mL}$ ; V 血清(浆): 血清(浆)体积,  $0.1\text{mL}$ ; V 样本: 反应体系中加入的样本体积:  $0.02\text{mL}$ ; W: 样本质量, g; Cpr: 样本蛋白浓度,  $\text{mg/mL}$ ; N: 细胞或细菌总数, 以  $10^4$ 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  $\Delta A_{\text{测定}} > 1.5$ , 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  $37^\circ\text{C}$ 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  $0.108\text{g}$  兔肌肉组织加入  $1\text{mL}$  提取液进行冰浴匀浆,  $10000\text{g}$   $4^\circ\text{C}$ 离心  $10\text{min}$ , 取上清至另一 EP 管中, 加入  $500\mu\text{L}$  的氯仿充分震荡混匀,  $10000\text{g}$   $4^\circ\text{C}$ 离心  $3\text{min}$ , 取上清, 置冰上按照测定步骤操作, 使用 96 孔板测得计



算  $\Delta A$  测定=0.222-0.118=0.104 ,  $\Delta A$  标准=A 标准-A 空白=0.466-0.118=0.348 ,

按样本质量计算含量得: ATP 含量( $\mu\text{mol/g}$  质量) = $0.4 \times \Delta A$  测定  $\div$   $\Delta A$  标准  $\div$  W=1.107  $\mu\text{mol/g}$  质量。

2 、取 0.1g 蒜苗加入 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 96 孔板测得计算 $\Delta A$  测定=0.284-0.118=0.166 ,  $\Delta A$  标准=A 标准-A 空白=0.466-0.118=0.348 ,

按样本质量计算含量得: ATP 含量( $\mu\text{mol/g}$  质量) = $0.4 \times \Delta A$  测定  $\div$   $\Delta A$  标准  $\div$  W=1.908  $\mu\text{mol/g}$  质量。