



## ATP 含量检测试剂盒(WST 显色法)可见分光光度法

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°C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°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;

6. 标准品: 5 mg ATP。临用前加入 0.826 mL 蒸馏水配成 10 $\mu$ 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;

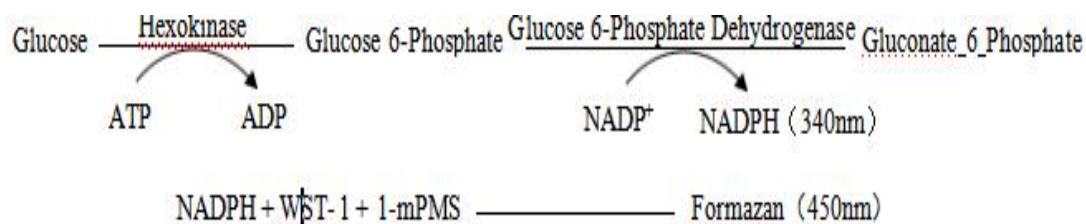
7. 0.3125 $\mu$ mol/mL 标准溶液的配制: 临用前吸取 20 $\mu$ L 10  $\mu$ mol/mL 的 ATP 标准溶液和 620 $\mu$ L 蒸馏水混合配制成 0.3125 $\mu$ mol/mL 标准溶液, 用于标准管的测定;

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。

### 产品说明:

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、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**

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°C 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°C 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  $\Delta A$  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

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

### 2. 按样本质量计算

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

### 3. 按蛋白浓度计算：

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

#### 4. 按细菌或细胞数量计算

ATP 含量( $\mu\text{mol}/10^4\text{cell}$ )= C 标准 $\times\Delta A$  测定 $\div\Delta A$  标准 $\times V$  提取 $\div N = 0.3125\times\Delta A$  测定 $\div\Delta$

A 标准 $\div N$

C 标准: 标准溶液浓度,  $0.3125\mu\text{mol}/\text{mL}$ ; 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,  $0.1\text{mL}$ ; W: 样本质量, g;

Cpr: 样本蛋白浓度,  $\text{mg}/\text{mL}$ ; 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  $\Delta A$  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  $0.108\text{g}$  小鼠脑加入  $1\text{mL}$  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  $1\text{mL}$  玻璃比色皿测得计算 $\Delta A$  测定 $=0.283-0.154=0.129$ ,  $\Delta A$  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( $\mu\text{mol}/\text{g}$  质量) $=0.3125\times\Delta A$  测定 $\div\Delta A$  标准 $\div W=0.899\mu\text{mol}/\text{g}$  质量。

2、取  $0.111\text{g}$  绿萝叶片加入  $1\text{mL}$  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  $1\text{mL}$  玻璃比色皿测得计算 $\Delta A$  测定 $=0.387-0.154=0.233$ ,  $\Delta A$  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( $\mu\text{mol}/\text{g}$



质量)= $0.3125 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W = 1.58 \mu\text{mol/g}$  质量。