



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-1Method)

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

自备试剂：该试剂盒实验过程中需自备试剂，详情见网站说明书

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：

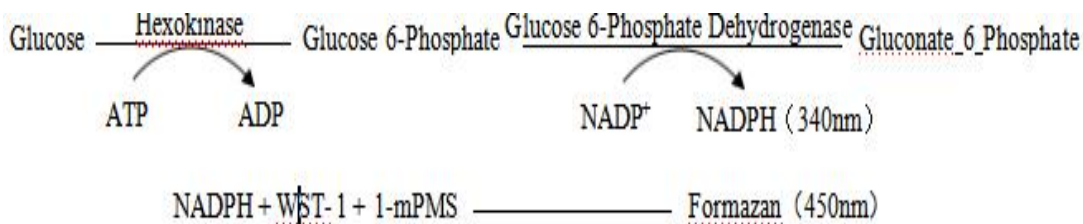


1. 提取液：低温条件下，可能有结晶析出，放于 60°C 水浴加热溶解即可，不影响使用；
2. 试剂二：临用前加入 7 mL 蒸馏水充分溶解，可加热促进溶解，用不完的试剂 2-8°C 保存 4 周；
3. 试剂四：临用前取 1 支加入 0.2 mL 蒸馏水溶解，用不完的试剂 -20°C 分装保存 2 周，避免反复冻融；
4. 试剂五：临用前加入 3.2 mL 蒸馏水充分溶解，用不完的试剂 -20°C 分装保存 4 周，避免反复冻融；
5. 试剂六：临用前取 1 支加入 0.25 mL 蒸馏水备用，用不完的试剂 -20°C 分装保存 2 周，避免反复冻融；
6. 标准品：5 mg ATP。临用前加入 0.826 mL 蒸馏水配成 10 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 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 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 标准溶液的配制：临用前吸取 20 μL 10 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 的 ATP 标准溶液和 620 μL 蒸馏水混合配制成 0.3125 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 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=1 mL：1 mL：0.1 mL：0.4 mL：0.1 mL 的比例配制 (2.6 mL，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 450 nm 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（10⁴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 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

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



ΔA 标准 $\div W$

3. 按蛋白浓度计算

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

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
 ΔA 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， 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 ； C_{pr} ：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($\mu\text{mol}/\text{g}$ 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 0.111g 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 μ 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(μ mol/g 质量) =0.3125 \times ΔA 测定 \div ΔA 标准 \div W=1.58 μ mol/g 质量。