



# 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°C

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°C保存 |
| 试剂一  | 液体 45 mL×1 瓶 | 2-8°C保存 |
| 试剂二  | 粉剂×1 瓶       | 2-8°C保存 |
| 试剂三  | 液体 8 mL×1 瓶  | 2-8°C保存 |
| 试剂四  | 粉剂×3 支       | -20°C保存 |
| 试剂五  | 粉剂×1 瓶       | 2-8°C保存 |
| 试剂六  | 粉剂×3 支       | -20°C保存 |
| 试剂七  | 液体 12 mL×1 瓶 | 2-8°C保存 |
| 标准品  | 粉剂×1 支       | -20°C保存 |

溶液的配制：

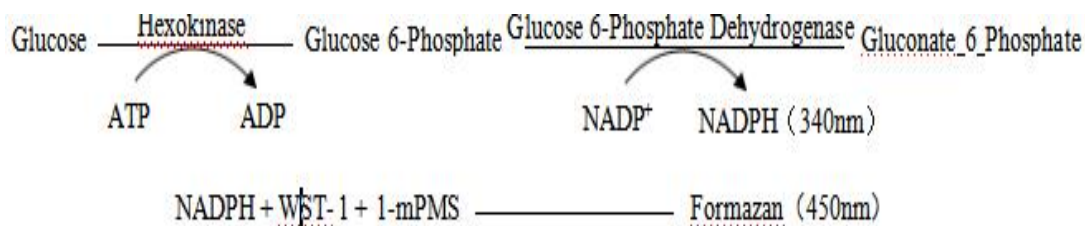
1. 提取液：低温条件下，可能有结晶析出，放于 60°C水浴加热溶解即可，不影响使用；



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 0.2mL 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°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)。
- 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°C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°C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

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

### 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:

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



$$=0.3125 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$

#### 4. 按细菌或细胞数量计算

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

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<sub>pr</sub>: 样本蛋白浓度, mg/mL; N: 细胞或细菌总数, 按 10<sup>4</sup>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°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 $\Delta A_{\text{测定}} = 0.283 - 0.154 = 0.129$ ,  $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.569 - 0.154 = 0.415$ , 按样本质量计算含量得: ATP 含量( $\mu\text{mol}/\text{g}$  质量) =  $0.3125 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W = 0.899 \mu\text{mol}/\text{g}$  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 $\mu\text{L}$  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 $\Delta A_{\text{测定}} = 0.387 - 0.154 = 0.233$ ,



$\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.569 - 0.154 = 0.415$ ,按样本质量计算含量得: ATP 含量( $\mu\text{mol/g}$  质量)  $= 0.3125 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W = 1.58 \mu\text{mol/g}$  质量。