



ATP 含量检测试剂盒微量法(WST 显色法)(微量法)

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

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 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 4 mL×1	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°C 水浴加热溶解即可，不影响使用；
- 2、试剂二：临用前加入 3.5mL 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；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 1mL 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 0.25mL 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：5mgATP。临用前加入 0.826mL 蒸馏水配成 10 μ 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 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 480 μ L 蒸馏水混合配制成 0.4 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。



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/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 (mL)	测定管	标准管	空白管
样本	20	-	-
标准液	-	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

三、ATP 含量计算

1、血清(浆)中 ATP 含量计算:

$$\begin{aligned} \text{ATP 含量}(\mu\text{mol/mL}) &= C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times (V_{\text{提取}} + V_{\text{血清(浆)}}) \div V_{\text{血清(浆)}} \\ &= 4.4 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \end{aligned}$$

2.按样本质量计算:

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



W

3.按蛋白浓度计算:

ATP 含量($\mu\text{mol}/\text{mgprot}$) = $C \text{ 标准} \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \times V \text{ 样本} \div (V \text{ 样本} \times Cpr) = 0.4 \times \Delta A$

测定 $\div \Delta A \text{ 标准} \div Cpr$ 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, $0.4\mu\text{mol}/\text{mL}$; 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: 0.02mL ; W: 样本质量, g;

Cpr: 样本蛋白浓度, 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 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 兔肌肉组织加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆, $10000\text{g}4^\circ\text{C}$ 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, $10000\text{g}4^\circ\text{C}$ 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 $\Delta A \text{ 测定} = 0.222 - 0.118 = 0.104$, $\Delta A \text{ 标准} = A \text{ 标准} - A \text{ 空白} = 0.466 - 0.118 = 0.348$, 按样本质量计算含量得: $\text{ATP 含量}(\mu\text{mol}/\text{g 质量}) = 0.4 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W = 1.107\mu\text{mol}/\text{g 质量}$ 。

2、取 0.1g 蒜苗加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆, $10000\text{g}4^\circ\text{C}$ 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，10000g4 $^{\circ}$ 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 ΔA 测

定=0.284-0.118=0.166, ΔA 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(μ mol/g 质量) =0.4 \times ΔA 测定 \div ΔA 标准 \div W=1.908 μ mol/g 质量。