

ATP 含量检测试剂盒（WST 显色法）说明书

可见分光光度法

货号：BC5470

规格：50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

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

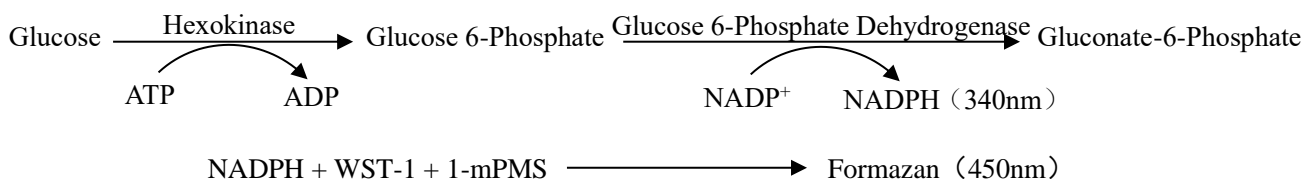
溶液的配制：

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 0.2 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 μmol/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 μmol/mL 标准溶液的配制：临用前吸取 20 μL 10 μmol/mL 的 ATP 标准溶液和 620 μL 蒸馏水混合配制成 0.3125 μmol/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（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

- 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℃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℃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℃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

ATP 含量 ($\mu\text{mol/g}$ 质量) = C 标准 \times ΔA 测定 \div ΔA 标准 $\times V$ 提取 $\div W = 0.3125 \times \Delta A$ 测定 $\div \Delta A$ 标准 $\div W$

3. 按蛋白浓度计算:

ATP 含量 ($\mu\text{mol/mg prot}$) = 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 ($\mu\text{mol}/10^4$ 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, $0.3125\mu\text{mol/mL}$; 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; Cpr: 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 ($\mu\text{mol/g}$ 质量) $=0.3125 \times \Delta A$ 测定 $\div \Delta A$ 标准 $\div W=0.899\mu\text{mol/g}$ 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 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 ($\mu\text{mol/g}$ 质量) $=0.3125 \times \Delta A$ 测定 $\div \Delta A$ 标准 $\div W=1.58\mu\text{mol/g}$ 质量。

参考文献:

- [1] Lin X, Wu Y, Chen X, et al. Determination of adenosine phosphate in tobacco leaf by UPLC with phenol-TEA pretreatment [J]. Acta Tabacaria Sinica, 2014, 20(1): 26-31.
- [2] Beutler E, Mathai C K. A comparison of normal red cell ATP levels as measured by the firefly system and the hexokinase system[J]. Blood, 1967, 30(3): 311-320.

相关系列产品:

- BC0060/BC0065 Na⁺K⁺-ATP 酶活性检测试剂盒
BC0960/BC0965 Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATP 酶活性检测试剂盒

