Beijing Solarbio Science & Technology Co., Ltd
Tel: 400-968-6088
Fax: 010-56371281
Http://www.solarbio.com

ATP 含量检测试剂盒（WST 显色法）说明书

微量法

货号：BC5475

规格：100T/96S

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 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 瓶	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

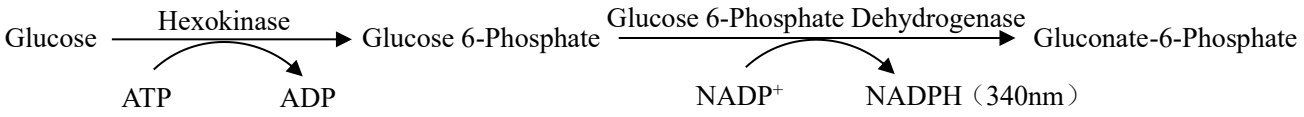
溶液的配制：

1、 提取液：低温条件下，可能有结晶析出，放于 60℃水浴加热溶解即可，不影响使用；
2、 试剂二：临用前加入 3.5 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 0.2 mL 蒸馏水溶解，用不完的试剂-20℃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 1 mL 蒸馏水充分溶解，用不完的试剂-20℃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℃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：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℃分装保存 4 周，避免反复冻融；
7、 0.4μmol/mL 标准溶液的配制：临用前吸取 20μL 10 μmol/mL 的 ATP 标准溶液和 480μL 蒸馏水混合配制成 0.4μmol/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。



NADPH + WST-1 + 1-mPMS ⟶ Formazan（450nm）

技术指标：

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/酶标仪、水浴锅/恒温培养箱、低温离心机、可调式移液枪、微量玻璃比色皿/96 孔板、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（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/酶标仪预热 30 min 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℃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(μL)	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℃水浴锅/恒温培养箱中培养 1h			
试剂七	30	30	30

充分混匀，吸取 200μL 反应液于微量玻璃比色皿或者 96 孔板中测定 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

ATP 含量(μmol/mL) = C 标准×ΔA 测定÷ΔA 标准×（V 提取+V 血清（浆））÷V 血清（浆）

=4.4×ΔA 测定÷ΔA 标准

2. 按样本质量计算

ATP 含量（μmol/g 质量）= C 标准×ΔA 测定÷ΔA 标准×V 提取÷W =0.4×ΔA 测定÷ΔA 标准÷W

3. 按蛋白浓度计算：

ATP 含量（μmol/mg prot）= C 标准×ΔA 测定÷ΔA 标准×V 样本÷（V 样本×Cpr）=0.4×ΔA 测定÷ΔA 标准÷Cpr

4. 按细菌或细胞数量计算

ATP 含量(μmol/10^4 cell）= C 标准×ΔA 测定÷ΔA 标准×V 提取÷N = 0.4×ΔA 测定÷ΔA 标准÷N

C 标准：标准溶液浓度，0.4μmol/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℃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，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，置冰上按照测定步骤操作，使用 96 孔板测得计算 ΔA 测定=0.222-0.118=0.104，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（μmol/g 质量）=0.4×ΔA 测定÷ΔA 标准÷W=1.107μmol/g 质量。

2、 取 0.1g 蒜苗加入 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（μmol/g 质量）=0.4×ΔA 测定÷ΔA 标准÷W=1.908μmol/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