

ATP含量(WST显色法)试剂盒

规格：48样

检测原理：微量法

编号：JLC_K14914

检测波长：450nm

注意

正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定。

测定意义

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。

测定原理

己糖激酶（HK）催化葡萄糖和ATP生成6-磷酸葡萄糖，后者在6-磷酸葡萄糖脱氢酶作用下生成NADPH。NADPH在电子耦合试剂存在下，将WST-8还原为水溶性橙黄色的formazan，该产物在450nm处有特征吸收峰。

自备实验用品及仪器

分光光度计/酶标仪、水浴锅、可调式移液枪、微量石英比色皿/96孔板、研钵和蒸馏水。

试剂盒组分与配制

酸性提取液：液体60mL×1瓶，4℃保存；

碱性提取液：液体60mL×1瓶，4℃保存；

试剂一：液体0.75mL×1支，-20℃避光保存；

试剂二：液体 10mL×1瓶，-20℃避光保存；

试剂三：液体0.75mL×1支，-20℃避光保存；

试剂四：液体1 mL×1，-20℃避光保存；

标准品：粉剂×1支，-20℃避光保存；(临用前加入985.8μL蒸馏水配成10μmol/mL的ATP

标准溶液，然后稀释20倍配置成0.5μmol/mL的标准液)

ATP提取

1、血清（浆）中ATP的提取：按照血清（浆）体积（mL）：酸性提取液体积（mL）为1：5~10的比例（建议取约0.1mL血清（浆），加入1mL酸性提取液），进行冰浴匀浆，8000g 4℃离心10min；取上清液至另一EP管中，加入约等体积的碱性提取液使之PH为6-7，混匀，8000g 4℃离心10min，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）：酸性提取液体积(mL)为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL酸性提取液），进行冰浴匀浆，8000g 4℃离心10min，取上清至另一EP管中，加入约等体积的碱性提取液使之PH为6-7，混匀，8000g 4℃离心10min，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）：酸性提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细菌或细胞加入1mL酸性提取液），超声波破碎1min（冰浴，强度20%或200W，超声2s，停1s），8000g 4℃离心10min；取上清液至另一EP管中，加入约等体积的碱性提取液使之PH为6-7，混匀，8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测（不可用于蛋白质含量测定）。

测定操作

1、酶标仪预热30min以上，设置温度25℃，调节波长至450nm，蒸馏水调零。

2、加样表（在EP管或96孔板中加入下列试剂）：

试剂（μL）	空白管（只做一）	标准管（只做一管）	测定管
样本	-	-	10
0.5μmol /mL标准液	-	10	-
蒸馏水	10	-	-
试剂一	10	10	10
试剂二	150	150	150
试剂四	10	10	10
混匀，室温（25℃）下避光孵育5min后于450nm读取吸光值A1			
试剂三	10	10	10
混匀，室温（25℃）避光孵育30min后于450nm读取吸光值A2。			
$\Delta A_{\text{测定}} = (A2 - A1)_{\text{测定}} - (A2 - A1)_{\text{空白}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = (A2 - A1)_{\text{标准}} - (A2 - A1)_{\text{空白}}$ 。			

注意：空白管和标准管通常只需要各做一个。

ATP含量计算

1、血清（浆）中ATP含量计算

$$\text{ATP含量}(\mu\text{mol/mL}) = [\text{C标准} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2)$$

2、组织、细菌或细胞中ATP含量计算

(1) 按蛋白浓度计算

$$\text{ATP含量}(\mu\text{mol/mg prot}) = [\text{C标准} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V1] \div (V1 \div \text{Cpr})$$

蛋白质含量需要另外测定。

(2) 按样本鲜重计算

$$\text{ATP含量}(\mu\text{mol/g鲜重}) = [\text{C标准} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V1] \div (W \times V1 \div V2)$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

$$\text{ATP含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = [\text{C标准} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V1] \div (500 \times V1 \div V2)$$

C标准：标准液浓度，0.5 $\mu\text{mol/mL}$ ； V1：加入反应体系中样本体积，0.01mL； V2：

加入提取液体积，默认为2mL； V3：加入血清（浆）体积：0.1mL；

Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； W：样本质量，g；

500：细胞或细菌总数，500万。

预实验的意义

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过3-5组预实验，判断试剂盒对于样本的适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。