

CheKine™ ATP 含量检测试剂盒（发光法）

货号: KTB1019

规格: 48 T/48 S

96 T/96 S

批号: 见产品标签

	检测范围: 1 nM-10 μ M		灵敏度: 1 nM
	适用样本: 动植物组织、细胞、细菌、血清（浆）		
	保质期: -20℃, 避光保存 12 个月		

01 背景与原理

本试剂盒检测原理是在 ATP、镁离子和氧气存在的条件下, 萤火虫荧光素酶 (Luciferase, Firefly luciferase, EC.1.13.12.7) 可以催化萤火虫荧光素 (Luciferin) 生成氧化荧光素 (Oxyluciferin), 在荧光素被氧化的过程中, 会产生光信号, 在一定范围内荧光强度与 ATP 浓度成正比关系。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Extraction Buffer	70 mL	70 mL×2	4℃
Assay Buffer	7 mL	14 mL	4℃
Firefly Luciferase Substrate	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20℃, 避光保存
Luciferase	8.8 μ L	17.5 μ L	-20℃
ATP Standard (5 mM)	500 μ L	500 μ L	-20℃, 避光保存

*请在实验前检查各组分的量。

*各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	化学发光仪/多功能酶标仪	多功能酶标仪须具备检测化学发光功能
耗材	96 孔酶标板	全黑或全白酶标板
其他	匀浆器（组织样本）、冰盒、低温离心机、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- 正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 本试剂盒兼容生物发光检测仪检测，请按照生物发光仪检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 建议实验者自行建立标准曲线以提高结果准确度。如未自行建立标准曲线，可参考结果展示部分的典型标准曲线公式进行结果计算。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，请在实验全程做好生物安全防护，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

05-1-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Extraction Buffer	即用型	实验过程中冰上放置；4℃保存
Assay Buffer	即用型；使用前，平衡到室温	4℃保存；有刺激性，注意防护
Luciferase	即用型	-20℃保存
Pre Reaction Buffer	临用前配制；用 Assay Buffer 溶解 Firefly Luciferase Substrate，然后将溶解后的 Firefly Luciferase Substrate 加入 Assay Buffer 瓶中，充分混匀；使用前平衡到室温	用不完的试剂-20℃分装避光保存 3 个月，-80℃分装避光保存 12 个月；禁止反复冻融。
ATP Standard (5 mM)	即用型；使用前平衡到室温	浓度为 5 mM；-20℃避光保存

05-1-2 标准品配制

取 20 μL ATP Standard (5 mM) 加入 980 μL Extraction Buffer，充分混匀得 100 μM ATP Standard，置冰上待用。用 Extraction Buffer 把 100 μM ATP Standard 稀释成适当的浓度梯度，具体的浓度需根据样品中 ATP 的浓度而定。初次检测可以设置 0、0.001、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3 和 10 μM 这几个浓度，在后续的实验，可以根据样品中 ATP 的浓度对标准品的浓度范围进行适当调整。每次实验都要做一次标准品检测，制作标曲；稀释后的标准品溶液不稳定，必须在 4 小时内使用。

序号	ATP Standard (μL)	Extraction Buffer (μL)	浓度 (nM)
1	50 μL of 100 μM	450	10000
2	15 μL of 100 μM	485	3000
3	5 μL of 100 μM	495	1000
4	50 μL of 3000 nM	450	300
5	50 μL of 1000 nM	450	100
6	50 μL of 300 nM	450	30
7	50 μL of 100 nM	450	10
8	50 μL of 10 nM	450	1
空白	0	500	0

05-2 样本制备

注意：

- (1) ATP，特别是裂解后样品中的 ATP 在室温不太稳定，需在 4℃或冰上操作，提取后的样本需要在 6 h 以内检测完。
- (2) 使用本试剂盒中的 Extraction Buffer 裂解获得的细胞或组织样品，不仅可以用于 ATP 检测，还可用于检测蛋白浓度、进行 SDS-PAGE 或一些常规的较易溶解蛋白的 Western 检测。
- (3) 对于一些特殊的组织或样品，如果发现检测出来的 ATP 水平显著低于预期水平，可以在裂解样品后并且在离心前，取部分样品煮沸 2 min 以充分释放 ATP。煮沸后样品中的蛋白会变性，从而会在后续的离心步骤中被沉淀，因此煮沸的样品不能用于蛋白浓度测定、SDS-PAGE 和 Western 检测。可以使用剩余的部分样品进行蛋白浓度测定、SDS-PAGE 和 Western 检测。
- 动植物组织：称取约 0.1 g 组织样本，加入 1 mL Extraction Buffer，冰浴匀浆，12000 g，4℃离心 5 min，取上清置冰上待测。
- 贴壁细胞：吸弃培养液，按照 6 孔板每孔加入 200 μL Extraction Buffer 的比例加入 Extraction Buffer，使用移液器进行反复吹打或晃动培养板使 Extraction Buffer 充分接触并裂解细胞，12000 g，4℃离心 5 min，取上清置冰上待测。
- 悬浮细胞：收集 5×10^6 个细胞，800 g，离心 2 min 弃上清，加入 1 mL Extraction Buffer，使用移液器进行反复吹打裂解细胞，12000 g，4℃离心 5 min，取上清置冰上待测。
- 细菌样本：收集 5×10^6 个细菌，800 g，离心 2 min 弃上清，加入 1 mL Extraction Buffer，冰浴超声波破碎细菌 1 min（功率 20%或 200 W，超声 2 s，间隔 1 s，重复 20 次），12000 g，4℃离心 5 min，取上清置冰上待测。

- **血浆、血清：**按照 0.1 mL 血清（浆）加入 0.9 mL Extraction Buffer 的比例，使用移液器反复吹打充分混匀，12000 g，4℃ 离心 5 min，取上清置冰上待测。

05-3 实验步骤

注意：

- (1) 一次性检测孔（包括标准孔）的数量需控制在 20 个以下。
 - (2) 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验，根据预实验的结果，适当调整标准品浓度。
 - (3) 样品的体积可以自行在 10-100 μL 范围内调节。如果样品中的 ATP 浓度比较低则可以加入 100 μL 样品，如果样品中 ATP 浓度比较高则可以加入较小体积的样品，同时标准品也需要使用相同的体积。如果样品中 ATP 的浓度特别高，可以用 Extraction Buffer 稀释样品后再测定。本试剂盒在加入 10-100 μL 标准品时，大致在 1 nM-10 μM 的浓度范围内有很好的线性关系。
1. **酶标仪准备：**发光检测仪或多功能酶标仪预热 30 min 以上。
 2. **Reaction Buffer 的配制：**临用前配制，根据实验测试量将 Pre Reaction Buffer 和 Luciferase 按照 1mL：1.26 μL 的比例混合均匀，现配现用。
 3. **检测体系配置：**在 96 孔全黑酶标板或全白酶标板各检测孔中按照如下方式操作，标准孔只需做 1-2 次：

试剂	测定孔（μL）	空白孔（μL）	标准孔（μL）
Reaction Buffer	100	100	100
室温（25℃）放置 3-5 min，消耗本底 ATP			
样本	20	0	0
Extraction Buffer	0	20	0
标准品	0	0	20

4. **发光值检测：**混匀后，立即于发光检测仪或多功能酶标仪中检测化学发光值，分别标记为 RLU_{测定}，RLU_{空白}和 RLU_{标准}。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧二维码或访问官网[\[https://www.abbkine.cn\]](https://www.abbkine.cn)进入“技术中心”查找“在线计算器”工具。

06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算 $\Delta RLU_{标准}=RLU_{标准}-RLU_{空白}$ ， $\Delta RLU_{测定}=RLU_{测定}-RLU_{空白}$ 。

2. 标准曲线绘制

以标准品浓度为 y 轴， $\Delta RLU_{标准}$ 为 x 轴，绘制标准曲线。将 $\Delta RLU_{测定}$ 代入方程得到 y 值（nM）。

3. 样本 ATP 含量计算

- 按液体体积计算：

$$ATP\ (nmol/mL) = (y \div 1000 \times V_{样}) \div (V_{样提} \div V_{样总}) \times n = 0.0002 \times y \times n$$

- 按样本质量计算：

$$ATP\ (nmol/g) = (y \div 1000 \times V_{样}) \div (W \times V_{样} \div V_{样总}) \times n = 0.001 \times y \div W \times n$$



- 按样本蛋白浓度计算：

$$\text{ATP (nmol/mg prot)}=(y\div1000\times V_{\text{样}})\div(V_{\text{样}}\times\text{Cpr})\times n=0.001\times y\div\text{Cpr}\times n$$

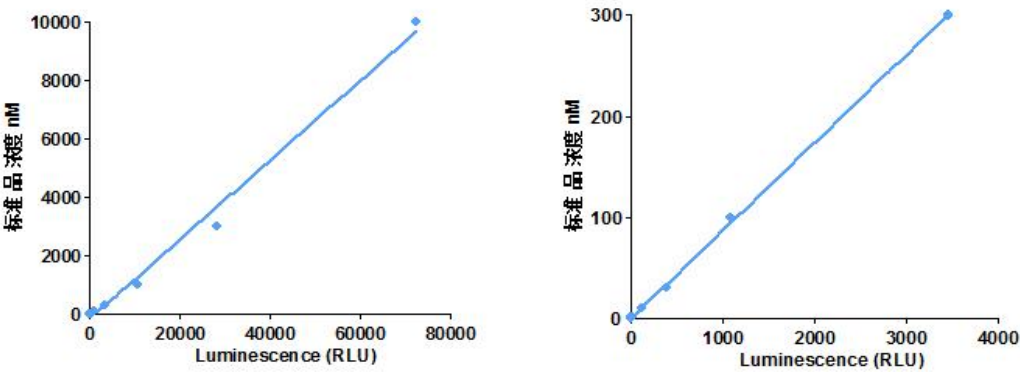
- 按细菌或细胞数量计算：

$$\text{ATP (nmol/10}^4\text{ Cells)}=(y\div1000\times V_{\text{样}})\div(N\times V_{\text{样}}\div V_{\text{样总}})\times n=0.001\times y\div N\times n$$

1000：1 nM=10⁻³ nmol/mL；V_样：加入样本体积，0.02 mL；V_{样提}：提取时加入液体样本体积，0.1 mL；V_{样总}：样本总体积，1 mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，0.1 g；N：细胞数量，以 10⁴ 为单位（例如细胞数量为 5×10⁶，N=500）；n：稀释倍数。

07 结果展示

典型标准曲线：y=0.1355x-153.86，R²=0.9913；y=0.0868x+0.3937，R²=0.9993



示例-1：取 0.1 g 拟南芥，按照测定步骤操作，用 96 孔全黑酶标板进行检测。测得ΔRLU_{测定}=RLU_{测定}-RLU_{空白}=1352-87=1265，代入标准曲线，计算 y=110.196。按样本质量计算得：ATP (nmol/g) =0.001×y÷W×n=1.10 nmol/g

08 FAQ

- 检测得到的样本ΔRLU_{测定}过高或者过低怎么办？

如果样本ΔRLU_{测定}高于标准品最高浓度ΔRLU_{标准}，则说明样本 ATP 含量太高，需用 Extraction Buffer 适当稀释（计算公式中乘以相应稀释倍数）。如果样本的ΔRLU_{测定}过低，可提高样本量。

- 检测过程中有哪些因素会影响检测结果？

由于温度对酶反应有影响，所以测定时，试剂均需达到室温后再进行检测；用移液器混匀时，要小心吸打，避免产生气泡；检测时需使用全黑色或白色的 96 孔板，防止相邻孔的干扰。

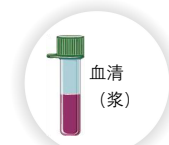
09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTA8010	双荧光素酶报告基因检测试剂盒
KTA8011	萤火虫荧光素酶检测试剂盒
BMC1041	发光法支原体检测试剂盒
PRP3004	荧光素酶

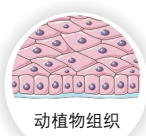
CheKine™ ATP 含量检测流程图（发光法）

(Abbkine 货号: KTB1019)

样本处理



0.1 mL 血清 (浆) 加入 0.9 mL Extraction Buffer 混匀



1 mL Extraction Buffer 冰浴匀浆



5×10^6 加入 1 mL Extraction Buffer, 反复吹打裂解细胞



6 孔板 每孔加入 200 μ L Extraction Buffer 的比例, 反复吹打或晃动以裂解细胞



1 mL Extraction Buffer 冰浴超声 200 W, 超 2 s, 隔 1 s, 总计 1 min



12000 g, 4°C 离心 5 min
取上清置冰上待测



Reaction Buffer:

临用前配制, 根据实验测试量将

Pre Reaction Buffer 和

Luciferase 按照 1mL: 1.26 μ L 的

比例混合均匀, 现配现用



标准品配制



体系配置

测定孔
Reaction Buffer 100 μ L

空白孔
Reaction Buffer 100 μ L

标准孔
Reaction Buffer 100 μ L

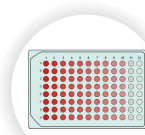
室温 (25°C) 放置 3-5 min, 消耗本底 ATP

样本 20 μ L

Extraction Buffer 20 μ L

标准品 20 μ L

数据检测



迅速混匀, 立即检测化学发光值
结果计算