

CheKine™ ATP 酶活性检测试剂盒（微量法）

货号: KTB1811

规格: 48 T/24 S

96 T/48 S

批号: 见产品标签

	检测范围: 0.015625-1 μmol/mL		灵敏度: 0.015625 μmol/mL
	适用样本: 动植物组织、细胞、细菌、血清（浆）		
	保质期: 4℃, 避光保存 12 个月		

01 背景与原理

ATP 酶是一类广泛存在于生物体各组织细胞中的关键酶，通过催化 ATP 水解生成 ADP 和无机磷，为物质跨膜转运、能量转换及信号传导等生命活动提供直接能量。ATP 酶活力的高低与细胞能量代谢状态密切相关，其活性变化常作为评估细胞功能损伤、组织缺氧及某些遗传性疾病的重要指标。

本试剂盒检测原理是基于 ATP 酶催化的酶促反应与无机磷显色反应的偶联。样品中的 ATP 酶可分解底物 ATP 生成 ADP 及无机磷 (Pi)。在反应体系中，ATP 酶水解 ATP 所释放的无机磷与显色试剂反应生成蓝色复合物，该复合物在 660 nm 处具有特征吸收峰。通过测定 660 nm 处的吸光度值，即可根据吸光度变化与 ATP 酶活性成正比的定量关系，计算出样品中 ATP 酶的活性水平。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Extraction Buffer	60 mL	60 mL×2	4℃
Reagent I	3 mL	6 mL	4℃
Reagent II	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃, 避光保存
Reagent III	2.5 mL	5 mL	4℃, 避光保存
Reagent IV	15 mL	30 mL	4℃, 避光保存
Reagent V	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃, 避光保存
Standard	500 μL	1 mL	4℃, 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	酶标仪	能测 660 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	去离子水	检测试剂配制用
其他	匀浆器（组织样本）、超声破碎仪（细胞或细菌）、水浴锅、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）。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计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；使用前平衡到室温	4℃保存
Reagent I	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Working Reagent II	临用前配制；48T 加入 0.75 mL 去离子水充分溶解，96T 加入 1.5 mL 去离子水充分溶解	未用完的试剂分装后-20℃避光保存 1 个月，禁止反复冻融
Reagent III	即用型；使用前平衡到室温	4℃避光保存
Reagent IV	即用型；使用前平衡到室温	4℃避光保存
Working Reagent V	临用前配制；48T 加入 3.5 mL 去离子水充分溶解，96T 加入 7 mL 去离子水充分溶解	未用完的试剂分装后-20℃避光保存 1 个月，禁止反复冻融
Standard	即用型；使用前平衡到室温	10 μmol/mL 标准品溶液；4℃避光保存

05-1-2 标准品配制

使用 10 μmol/mL Standard，按下表所示，进行下一步稀释。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	标准品 (μL)	去离子水 (μL)	浓度 (μmol/mL)
1	100 μL of 10 μmol/mL	900	1
2	200 μL of 1 μmol/mL	200	0.5
3	200 μL of 0.5 μmol/mL	200	0.25
4	200 μL of 0.25 μmol/mL	200	0.125
5	200 μL of 0.125 μmol/mL	200	0.0625
6	200 μL of 0.0625 μmol/mL	200	0.03125
7	200 μL of 0.03125 μmol/mL	200	0.015625
空白	0	200	0

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本。样本尽量新鲜提取，如果不能当天提取，则把完整细胞或者分装的组织块保存在-80℃，一个月内使用。当准备好进行该项实验时，将样本从-80℃拿出后，冰上解冻。但是请注意，这可能会影响样本的稳定性，实验结果可能会低于预期。

- 动植物样本：称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL Extraction Buffer，冰浴匀浆，10000 g，4℃离心 10 min，取上清置冰上待测。
- 细胞或细菌：收集 5×10⁶ 个细胞或细菌，用预冷的 PBS 清洗细胞或细菌，800 g 离心 2 min，弃上清（注意尽量去除管口及管壁残留液滴）。加入 1 mL Extraction Buffer 进行冰浴超声破碎。超声波破碎 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），4℃，8000 g 离心 10 min，取上清置冰上待测。
- 血清（浆）样本：直接测定。若浑浊可离心后再检测。

05-3 实验步骤

注意：Working Reagent 应为浅黄色，若无色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染。配制工作液建议使用新的玻璃器皿或一次性塑料器皿。

1. 酶标仪准备：预热 30 min 以上，调节波长到 660 nm。
2. Working Reagent：临用前配制；按照每孔 200 μL（Reagent IV 160 μL： Working Reagent V 40 μL，配制体积比 4：1）配制工作液，混合均匀，现配现用，配制好的工作液使用前需再次摇匀。
3. 酶促反应：在 EP 管中依次加入下列试剂，空白管和标准管不需要进行此步骤。

试剂	测定管 (μL)	对照管 (μL)
Reagent I	40	40
Working Reagent II	10	10
样本	50	0
混匀后盖紧，37℃准确孵育 15 min		
Reagent III	20	20
样本	0	50

4. 混匀后，4℃，7000 g，离心 10 min，取上清液至新的 EP 管。

5. 检测体系配制：在 96 孔板中按照如下方式操作（空白孔和标准孔只需做 1 次）。检测量大时，建议使用多通道移液器操作以提高加样速度。

试剂	空白孔 (μL)	标准孔 (μL)	测定孔 (μL)	对照孔 (μL)
上清液	0	0	40	40
去离子水	40	0	0	0
标准品	0	40	0	0
Working Reagent	200	200	200	200

6. 吸光度检测：混匀后，室温（25℃）放置 10 min，测定 660 nm 处吸光度，分别记为 $A_{\text{空白}}$ 、 $A_{\text{标准}}$ 、 $A_{\text{测定}}$ 、 $A_{\text{对照}}$ 。

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 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。

2. 标准曲线绘制

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

3. 样本 ATP 酶活计算

- 按蛋白浓度计算：

单位的定义：37℃条件下，每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟产生 1 μmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

ATP 酶活 (U/mg prot)= $y \times V_{\text{酶促}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 0.16 \times y \div \text{Cpr}$

- 按样本质量计算：

单位的定义：37℃条件下，每 g 组织在反应体系中每分钟产生 1 μmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

ATP 酶活 (U/g)= $y \times V_{\text{酶促}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 0.16 \times y \div W$

- 按样本体积计算：

单位的定义：37℃条件下，每 L 液体在反应体系中每分钟产生 1 μmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

ATP 酶活 (U/L)= $y \times V_{\text{酶促}} \div (V_{\text{样}} \times 10^{-3}) \div T = 160 \times y$

- 按细胞或细菌数量计算：

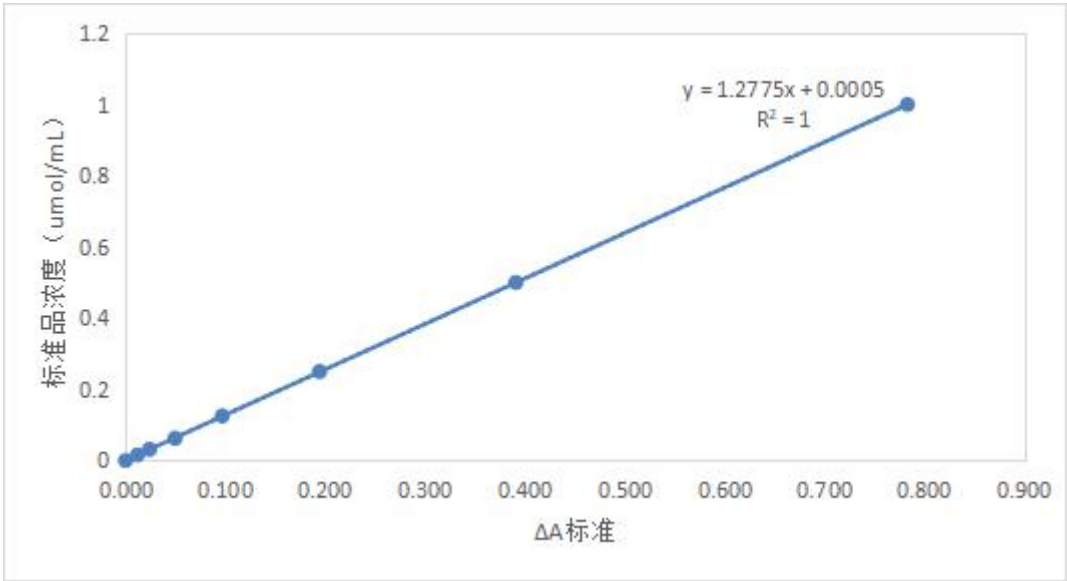
单位的定义：37℃条件下，每 10⁶ 个细胞或细菌在反应体系中每分钟产生 1 μmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

ATP 酶活 (U/10⁶)= $y \times V_{\text{酶促}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times N) \div T = 0.16 \times y \div N$

$V_{\text{酶促}}$ ：酶促反应体系总体积，0.12 mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；10⁻³：单位换算系数，1 mL=10⁻³ L； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.05 mL；T：反应时间，15 min； $V_{\text{样总}}$ ：加入 Extraction Buffer 体积，1 mL；W：样本质量，g；N：细胞或细菌数量，以 10⁶ 为单位（如细胞数量为 5×10⁶，N=5）。

07 结果展示

典型标准曲线： $y=1.2775x+0.0005$, $R^2=1$



示例-1: 取 0.1 g 小鼠肝脏, 用 Extraction Buffer 稀释 5 倍, 按照测定步骤操作, 用 96 孔板进行检测。测得 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.801 - 0.220 = 0.581$, 代入标准曲线, 计算 $y = 0.743$ 。稀释 5 倍的小鼠肝脏: ATP 酶活 (U/g) = $0.16 \times y \times W = 1.189$ U/g。

08 FAQ

- 检测得到的样本 $\Delta A_{\text{测定}}$ 过高或者过低怎么办?
如果 $\Delta A_{\text{测定}}$ 小于 0.01 可适当加大样本量。如果 $\Delta A_{\text{测定}}$ 大于 1 $\mu\text{mol/mL}$ 的 $\Delta A_{\text{标准}}$, 样本可用 Extraction Buffer 进一步稀释, 或减少提取用样本量, 再重新进行提取。
- 对于低值样本如果 $\Delta A_{\text{测定}}$ 过低怎么办?
对于活性较低的样本 (如细胞或细菌), 可将酶促反应时间延长至 30 min 或 1 h, 以增加产物累积量, 便于检测。

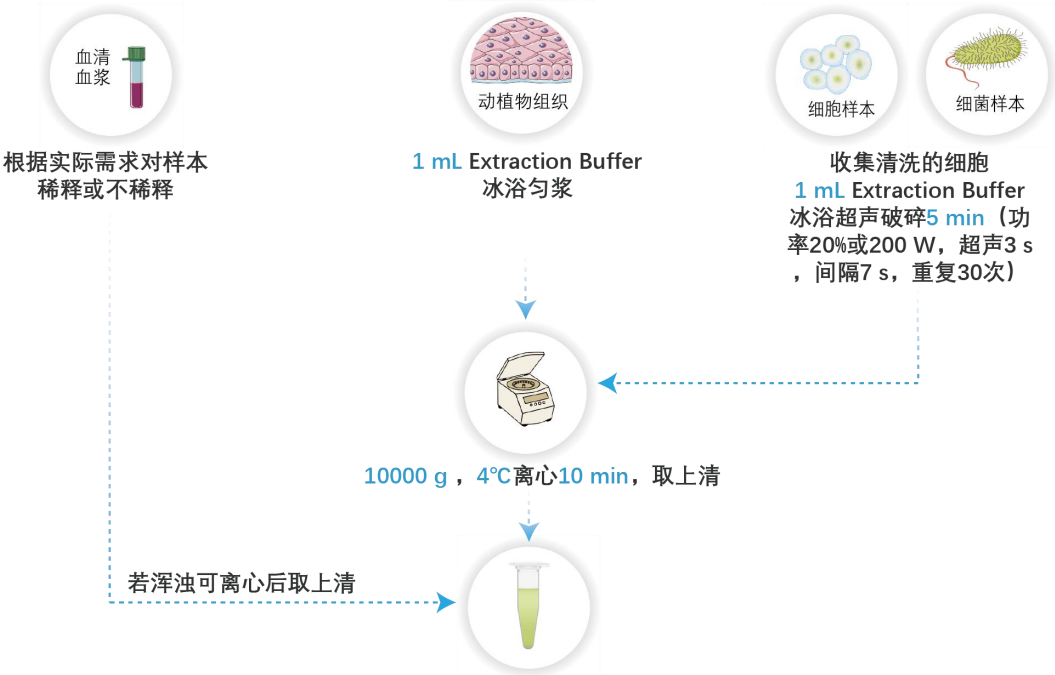
09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1810	CheKine™ Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -ATP 酶活性检测试剂盒 (微量法)
KTB1800	CheKine™ Na ⁺ /K ⁺ -ATP 酶活性检测试剂盒 (微量法)
KTB1016	CheKine™ ATP 含量检测试剂盒 (微量法)

CheKine™ ATP酶活性检测流程示意图

(Abbkin 货号：KTB1811)

样本处理



体系配置



数据检测

