

ENLITEN[®] ATP 发光检测试剂盒

在 Veritas[™] 微孔板发光检测仪上的应用



1. 应用说明

Turner Biosystems 公司的 Veritas[™] 微孔板发光检测仪与 ENLITEN[®] ATP 生物发光检测试剂盒连用为 ATP 检测提供了一种快速、灵敏的方法，对于生成和降解 ATP 酶的研究来说，这是非常有用、可靠的方法。另外，也可以通过检测微生物、食物残留或其他生物物质而间接检测 ATP。

依赖于 ATP 的荧光素在荧光素酶作用下会产生发光，它会被 Veritas[™] 微孔板发光检测仪检测到。同时，ATP 是荧光素氧化反应中的限制因素，光的强度和样品中的 ATP 浓度成正比例。在这种体系下检测到 ATP 的下限为 0.1fmol。（图 1）

The Promega ENLITEN[®] ATP Assay

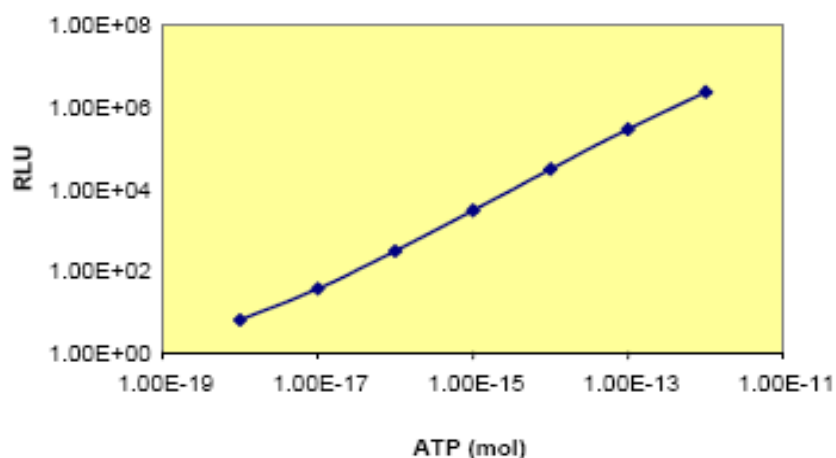


图 1 采用 Veritas[™] 微孔板发光检测仪和 ATP 检测试剂盒所获得的标准曲线。用无 ATP 水稀释 10 μ l 标准 ATP，而后加到 100 μ l rL/L 试剂的微型管中。

当您打算用 ENLITEN 试剂盒检测 ATP 时，荧光素酶反应中的几个关键因素不容忽视。首先，rL/L 最好在 23-25 $^{\circ}$ C、PH 7.73 条件下反应。一些盐类和不解离的化学物质会削弱光的产生，因此，在样品制备过程中，缓冲液和 ATP 抽提试剂的选择要格外小心。另外您也能通过和标准品中检测到的相对光强度对比来核对 ATP 的污染情况。

在您的样品中，ATP 或许会有不同的存在形式。比如，在细胞制备液中，ATP 会在培养液中，在处理细胞时或许会改变培养液中 ATP 的量。

如果您希望检测微生物或细胞中的 ATP，分析检测前肯定要先抽提 ATP，那么就肯定要用到三氯乙酸（TCA），因为它能从细胞中释放 ATP 并能灭活降解 ATP 的酶。但同时 TCA 也会

抑制荧光素酶反应，所以确定它的最佳用量非常重要。总体来说，0.5%-2.5% TCA（终浓度）对于细菌和真核细胞中 ATP 抽提是足够的。

标准曲线的制备对于正确分析样品中的 ATP 是非常有用的，所以标准曲线应该每天或有新的 rL/L 试剂被用时都应该制作，标准曲线中应该包含有用检测缓冲液稀释的不同浓度标准 ATP，这种缓冲液成分应该与检测样品中的缓冲液一致。

2. 所需器材

- [Veritas™微孔板发光检测仪](#)
- ENLITEN ATP 检测系统中的生物发光检测试剂盒（Promega，货号：FF2000），里面有 1 瓶 rL/L 试剂，12ml 缓冲液，1 瓶 ATP 标准样（ 1×10^{-7} M），25ml 无 ATP 水。
其他材料：
 - 可调的 p1000 移液器和枪头
 - 可调的 p200 移液器和枪头
 - 检测缓冲液
 - 1.5ml 微型管
 - 试管架
 - 腈质、乙烯基质或乳胶手套

注意：对乳胶过敏的人应用腈质、乙烯基质手套。**储存条件：**rL/L 试剂和配制的缓冲液需 -20°C 保存，ATP 标准需 -20°C 保存。

3. 试剂和标准制备

注意：ATP 污染会导致错误的结果和背景值的增高。务必在检测操作和试剂制备时戴手套防止 ATP 污染。

- a) 室温平衡样品缓冲液
- b) 打开 rL/L 试剂前，轻弹试剂瓶确保冻干物都收集到瓶底。
- c) 将 rL/L 试剂缓冲液加到 rL/L 试剂瓶中。
- d) 连续并缓慢地颠倒试剂瓶几次，以便能充分溶解。**不要振摇试剂瓶。**
- e) 使用前，室温静止平衡 rL/L 试剂 1 小时

注意：rL/L 试剂能常温保存 8 个小时，分开使用可在 -20°C 长期保存。

- f) 用检测缓冲液 10 倍比稀释 ATP 标准样（ 1×10^{-7} M），直到稀释至 1×10^{-11} M。

4. 仪器安装

- a) 双击 Veritas 图标运行软件。
- b) 从 "Welcome to veritas" 对话框中点击 "Run Promega Protocol"。
- c) 从 Promega 预设程序中选择 "ENLITEN ATP"。

- d) 在"Main Dialog Box"中点击"Options", 选择需要检测的孔, 修改测量次数; 同时也可以
在"Other Options"中修改检测时间, 设置 10s 的样品检测时间, 修改结束点击"Apply
Changes", 返回"Main Dialog Box"窗口。
- e) 在"Main Dialog Box".中输入个人信息, 例如"Experiment", "Operator", "Plate No.",
and "Notes"

5. ATP 标准曲线

- a) 将 10 μ L 检测缓冲液加入有 100 μ L rL/L 试剂的 96 孔板中。
- b) 点击"Measure Luminescence" 图标开始检测。
- c) 记录下检测数值, 并可多次重复获得背景水平值, 然后从结果中除去背景平均值。
- d) 记录下检测数值, 并用以下浓度的 ATP 重复操作, 连续 5 个浓度级别从 1×10^{-11} 到 1×10^{-7}
M ATP。

6. 样品分析

- a) 将 10 μ L 检测缓冲液中的制备样品加入有 100 μ L rL/L 试剂。
- b) 点击"Measure Luminescence" 图标开始检测。
- c) 记录下检测数据, 并将剩余样品按步骤 6.1-6.2 操作。
- d) 根据标准曲线的绘制方式制取检测样品的相对光强度的曲线图, 以此获得检测样品的 ATP
浓度。

7. 关于 Veritas™ 微孔板发光检测仪

Veritas™ 微孔板发光检测仪是 Turner Biosystems 公司生产的一款专门用于生物发光与化学发光检测的微孔板型发光检测仪。Veritas™ 微孔板发光检测仪发光检测仪具有极高的检测灵敏度 (3×10^{-21} moles 荧光素酶) 和极宽的检测范围 (>9 数量级), 可以满足各种发光检测的需求。