

ENLITEN® ATP 生物发光检测试剂盒

在 Modulus™ 微孔板型多功能检测仪上的应用



1. 应用说明

Turner 的 Modulus™ 微孔板型多功能检测仪与 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。ATP 检测试剂盒可被用于直接检测细菌、酵母、真菌和其他微生物的含量，或用于检测酶促反应中生成或消耗 ATP 的量。

ATP 依赖的萤火虫荧光素酶发光反应可以由 Modulus™ 微孔板型多功能检测仪检测。当整个反应中 ATP 为限速条件时，反应的发光强度与样品中的 ATP 线性相关。

Modulus™ 微孔板型多功能检测仪具有极高的检测灵敏度，这使得它可以检测到 attmole 水平的 ATP。使用 Promega 的 ENLITEN® ATP 生物发光检测试剂盒可以检测到 1attomoles 或 0.5fg 的 ATP。

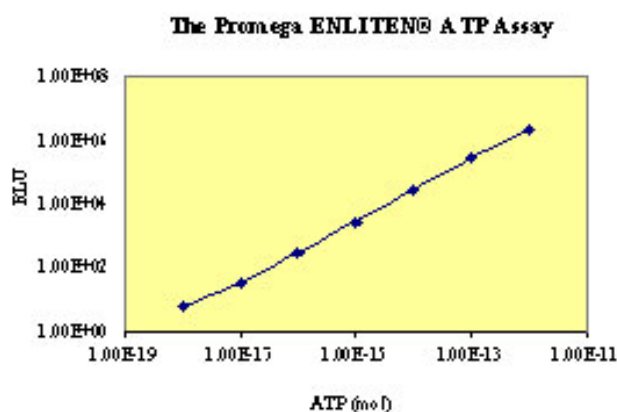


图 1 使用 Modulus™ 微孔板型多功能检测仪获得的 ATP 标准曲线。96 孔板中含有 10ul 溶解于 HEPES 缓冲液的 ATP 标准品，加入的检测液为 100ul

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℃、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

- [Modulus™微孔板型多功能检测仪](#)
- Modulus™ 发光检测模块
- Modulus™ 自动进样系统
- ENLITEN ATP 检测系统中的生物发光检测试剂盒（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。
- 96 孔白色不透明板(E&K Scientific, EK-25075)
- p10, p200 移液器和枪头
- 检测缓冲液
- 1.5ml 离心管
- 腈质、乙烯基质或乳胶手套

注：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℃ 保存，ATP 标准需-20℃ 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。

3.1 室温平衡样品缓冲液

3.2 打开 rL/L 试剂前，轻弹试剂瓶确保冻干物都收集到瓶底。

3.3 将 rL/L 试剂缓冲液加到 rL/L 试剂瓶中。

3.4 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。**

3.5 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℃ 长期保存。

3.6 用检测缓冲液 10 倍倍比稀释 ATP 标准样（ 1×10^{-7} M），直到稀释至 1×10^{-13} M。

4.仪器准备

4.1. 为防止 ATP 污染，可以使用 50%的漂白剂（次氯酸钠）初始化进样器，并浸泡进样器 1 个小时。然后使用无 ATP 的蒸馏水或去离子水冲洗自动进样器 10 次。

4.2. 在 Modulus 触摸屏的主界面，选择“select Protocol”，根据提示选择“Luminescence”，然后选择“ENLITEN ATP”检测程序，结束

4.3. 这时 Modulus 进入仪器控制界面，在控制界面上显示所有的控制参数：整合时间、进样器、进样体积、延迟时间等。默认 96 孔板所有孔为选中状态。

4.4. 可以通过板孔图标来选择需要检测的孔

4.5. 准备自动进样器：将进样器的进样管放入 rL/L 溶液瓶中

4.6. 初始化自动进样器：点击触摸屏上的“Setup”图标，按照提示一步一步进行进样器的初始化。

4.7. 通过触摸屏的“Door”图标打开仪器舱门，将微孔板 A1 对应微孔板托盘的右上角放入微孔板托盘，使用触摸屏的“Door”图标关闭舱门

4.8. 点击触摸屏的“Start”图标，开始检测

5. ATP 标准曲线

5.1. 在白色 96 孔板中加入 20ul 不同浓度的 ATP 和对照用的分析缓冲液，在 Modulus 中选择要检测的孔

5.2. 使用上节的 ENLITEN ATP 检测步骤检测

5.3. 记录 ATP 浓度由 $1 \times 10^{-13} \text{M}$ 至 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 的发光值

6. 样品分析

6.1. 在白色 96 孔板中加入 10ul 样品，在 Modulus 中选择要检测的孔

6.2. 使用 ENLITEN ATP 检测步骤检测

6.3. 每个样品检测结束后，其发光值将直接显示在 Modulus 屏幕上

6.4. 当所有样品检测完成，使用 u 盘将检测数据转移到个人电脑上

6.5. 将微孔板从 Modulus 中移除

6.6. 使用自动进样器的反向回抽功能将管路中的试剂回收至试剂瓶中

6.7. 使用后使用冲洗功能清洗自动进样系统

6.8. 更多自动进样器的使用请参考使用手册

7 结果

- 灵敏度: 1×10^{-18} moles (1 attomole)ATP, 使用 ENLITEN® ATP 检测试剂盒
- 动态范围: > 6 个数量级, 使用 ENLITEN® ATP 检测试剂盒

8 关于 Modulus™ 微孔板型多功能检测仪

Modulus™ 微孔板多功能检测仪是 Turner Biosystems 公司生产的一款集生物发光与化学发光检测、荧光检测、可见光吸光度检测于一体的多功能检测仪器。Modulus™ 微孔板多功能检测仪具有发光检测模块、荧光检测模块、吸收光检测模块、自动进样系统，且可以自由组合，或后期自行升级安装。用户可根据实验需求选择合适的功能模块，来完成生物与化学发光、荧光和可见光吸光度检测。