

ATP 生物发光测定试剂研究进展

吴慧清 李程思 吴清平* 张菊梅

(广东省微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东省微生物应用新技术公共实验室
广东省华南应用微生物重点实验室省部共建国家实验室培育基地 广东 广州 510070)

摘要: 萤火虫荧光素酶是 ATP 生物发光试剂的关键组成部分, 可通过萤火虫尾提取纯化或基因工程技术制备, 酶的活力和纯度决定了 ATP 生物发光试剂的性能。迄今许多先进技术在 ATP 生物发光试剂的制备中均有应用, 包括酶基因工程改造技术、ATP 循环的酶法放大技术、荧光素酶蛋白的活力及发光稳定技术, 特异的细胞 ATP 提取技术等。ATP 生物发光试剂的研究焦点主要集中在提高发光试剂的检测灵敏度和性能、增加产品的适应性等方面。

关键词: ATP 生物发光试剂, 萤火虫荧光素酶, 制备研究

Reserach progress on ATP bioluminescence reagent

WU Hui-Qing LI Cheng-Si WU Qing-Ping* ZHANG Ju-Mei

(Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, GuangDong Open Laboratory of Applied Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology (Ministry_Guangdong Province Jointly Breeding Base), South China Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

Abstract: Firefly luciferase is the key component of ATP bioluminescence reagent, gained from firefly lantern throuh extraction and purification or preparation through genetic engineering, the performance of ATP bioluminescence reagent was decided by the vitality and the purity of firefly luciferase. Up to now, many present advanced technology were applied on

基金项目: 广东省科技计划项目(No. 2010B030900013, 2011A090200100)

*通讯作者: Tel: 86-20-87668132; 信箱: wuqp203@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-02-14; 接受日期: 2012-05-02

preparation the reagent such as genetic engineering, ATP amplification device, stabilization technology of luciferase protein and luminescence, and so on. Now research focus on improving detection sensitivity and luminescence performance of the ATP bioluminescence reagents, further raising the adaptability of ATP bioluminescence reagents.

Keywords: ATP bioluminescence reagent, Firefly luciferase, Preparation

ATP 生物发光技术以测量萤火虫荧光素酶 (Firefly luciferase, FL) 和荧光素反应产生的光的数量为基础, 为广泛范围内的物质提供简单、快速、高灵敏度的分析方法^[1]。在食品卫生领域由于 ATP 生物发光技术无需培养过程, 操作简便, 灵敏度高, 数分钟内可得到结果, 具有其他微生物检测方法无法比拟的优势, 是目前检测微生物最快的方法。其关键技术包括 ATP 发光试剂、样品预处理技术和发光检测仪三大部分。ATP 生物发光试剂主要由萤火虫荧光素酶(FL)及其发光底物萤火虫荧光素(LH₂)、酶和发光稳定剂、细胞 ATP 提取剂及样品预处理剂等组成。萤火虫荧光素酶是 ATP 生物发光试剂的关键组分之一, 虫光素酶的活力和纯度决定了 ATP 生物发光试剂的性能, 同时 ATP 发光试剂的检测灵敏度和检测数据的重现性与虫光素酶试剂的性能关系密切, 研发 ATP 生物发光试剂的关键点主要集中在提高发光试剂的检测灵敏度和性能、增加产品的适应性等方面。

ATP 生物发光技术产生于 20 世纪 70 年代中期, 迄今日本、美国、德国等发达国家已经研制出了先进的发光检测仪和高灵敏度的发光试剂盒, 已经在细胞增殖、细胞毒性和生物量计数等方面得到广泛应用^[1]。然而到目前为止我国仍未大规模应用 ATP 生物发光技术进行实际样品的检测, 主要原因是检测费用较高, 而国产的 ATP 生物发光试剂的性能和水平仍相对较低, 因此改进 ATP 生物发光试剂的制备技术和提升性价比是促进 ATP 生物发光技术在我国大规模应用

的关键。

1 萤火虫荧光素酶特性

萤火虫荧光素酶(EC 1.13.12.7)与生物发光有关, 广泛用于酶法 ATP 测试。1956 年, McElroy 等首次从北美萤火虫(*Photinus pyralis*)中提取到荧光素酶, 此后各国研究人员相继报道了对各种发光生物中荧光素酶的研究。每一种萤火虫发出的光通过其颜色显光规律来确定, 也用于萤火虫荧光素酶活性位点的测定, 颜色变化从绿(λ_{\max} 为 543 nm)至红, 而且每一种甲虫有一种明显的发光规律, 用于异性识别^[2]。应用最广而且是一个商业化克隆的是北美萤火虫(*Photinus pyralis*)荧光素酶, 此酶为一个 61 kD 的单链酶, 发黄绿光(550 nm–590 nm), 生理 pH 条件下最大发光在 562 nm 处^[3], 其生物发光反应非常有效, 接近消耗 1 摩尔 LH₂ 产生 1 个光子(光产量达 0.88), 结构上包含一个大型 N 端的活性位点功能域(1–436 残基), 灵活的连接多肽(436–440 残基)和一个相对 N 末端较小的 C 末端区域(440–550 残基)。N 末端和 C 末端相对接近, 形成一个夹心, 物质在这里反应, 活性袋位于 N 末端, 认为 C 末端区域对腺苷酰(化)作用和氧化步骤很重要^[4]。另外此酶已经成为基因表达控制的一个特别有用的工具, 研究表明 *P. pyralis* 诱变子只要一个同样的底物, 可发展为同时进行几个产物分析的工具^[5]。

研究表明日本萤火虫(*Luciola cruciata*)产生的荧光素酶(FL)含 548 个氨基酸, 分子量约

61 kD, 与北美萤火虫 FL 氨基酸序列 67%同源^[6]。对东欧萤火虫(*L. mingrelica*)光素酶的研究焦点集中在与 *Photinus*、*Photuris* 和东欧种 *Lampyrus*、*Luciola*、*Hotaria*、*Pyrocoelia* 近缘种中。通过 CDNA 克隆来自巴西 *Cratomorphus* 地区萤火虫幼虫荧光素酶显示此酶编码 1 978 bp 长链氨基酸残基, 与 *L. noctiluca* (93%)和 *Pyrocoelia* spp. (91%) 具有最大的相似性^[7]。

萤火虫荧光素反应产生的发光颜色依赖于在荧光素酶分子作用下氧化型荧光素的种类, Viviani 等研究发现萤火虫荧光素酶在酸性条件下发出的光谱向红光转移^[8]。Yuichi Oba 等研究表明萤火虫荧光素酶在 ATP、Mg²⁺和辅酶 A (CoA)存在条件下催化脂肪酸经乙酰辅酶 A 形成酯脂肪酸乙酰盐^[9]。这证明了萤火虫体内发光器官中带有过氧化物体的荧光素酶可能是一种双功能酶, 不仅催化生物发光反应也催化脂肪酸乙酰辅酶 A 的合成反应。

2 萤火虫的基因克隆、表达及代谢工程改造法提高荧光素酶的抗性和活力

荧光素酶基因在实验中用做基因表达的报告基因, 首先是从北美萤火虫中分离的, 接着在日本萤火虫分离到^[10]。Lee 等通过 cDNA 反转录编码荧光素酶基因进而克隆和表达萤火虫 *Pyrocoelia rufa* 荧光素酶^[11]。Michel 等通过在昆虫细胞中表达和纯化带有组氨酸尾巴的荧光素酶, 构建了另一条大规模生产荧光素酶的途径, 最终生产高纯度蛋白的产率可达 23 mg/L 细胞悬液^[12]。Tisi 等研制了一种新型热稳定的荧光素酶, 构建了相对野生型包含 4 个重组点的荧光素酶, 大大改进了酶的热稳定性^[3]。Gomi 等通过 cDNA 编码进行了分子克隆和表达萤火虫荧光素酶^[13]。Hattori 等研究了使用抗氯化丙氨的重组荧光素酶强化微生物生物量的测试, 闪光型试剂相对辉光

型试剂产生 20 倍以上的生物发光强度。闪光型试剂可用于需要高灵敏度的与微生物相关的 ATP 测试^[14]。Viviania 等通过 cDNA 克隆和表达了 Brazilian *Cratomorphus* 地区萤火虫幼虫荧光素酶, 并与欧洲 *Lampyrus noctiluca* 和亚洲 *Pyrocoelia* 萤火虫荧光素酶进行相似性比较^[8]。Alipour 等进行了萤火虫 *Lampyrus turkestanicus* 萤火虫荧光素酶的分子克隆、序列分析和表达的研究^[15]。Branchini 等进行了意大利萤火虫 *Luciola italica* 荧光素酶的分子克隆和表达^[16]。Fujii 等通过基因工程改造增强荧光素酶的发光强度^[4], 在萤火虫 *Photinus pyralis* 中, 通过选择新型的具有较高发光活力的荧光素酶基因诱变体, 得到了一个发光活力高于野生型 10 倍发光活力的荧光素酶。Goerke 等首次研究了无细胞代谢工程产生高水平的生物活性 *Gaussia* 荧光素酶 (GLuc)^[17]。这种无细胞蛋白质合成程序可生产 412 mg/L 纯化的 GLuc, 而在大肠杆菌细胞内只产生 5 mg/L, 这种无细胞产物具有的发光活力达到 4.2×10^{24} photons/(s·mol), 是报道的荧光素酶特性的最高活力。迄今为止已经有大约 20 种萤火虫荧光素酶基因被分离^[18]。

3 萤火虫荧光素酶活力的稳定与抑制

萤火虫荧光素酶是蛋白质和脂类复合物, 在去氧胆酸钠中能使酶活性迅速减弱, Mg²⁺与 FL 结合能提高酶的活性; 磷脂是特定的酶激活剂, 能稳定 FL, 不致失活, 而长链胆碱衍生物 (C12-C18)能使 FL 快速、不可逆地失活; 牛血清白蛋白、辅酶 A (CoA)和重组人 α -突触核蛋白能显著提高 FL 的活性, 并促进光的产生^[19-22]。蔗糖、脯氨酸等能形成渗透压的物质对荧光素酶的活力有稳定作用^[21]。Rodionova 等研究了不同盐和表面活性剂对线蚓 (*Fridericia heliota*) 的荧光素酶生物发光的影响^[23]。结果表明阴离子表面活性

剂 SDS 对荧光素酶产生最强的抑制,而非离子表面活性剂对由蚯蚓新型荧光素酶催化具有增强作用,其中效果最好的是 Triton X-100。Moroz 等通过多元醇稳定含 *L. mingrelica* 萤火虫荧光素酶的效果^[24],结果表明在存在多元醇的情况下,ATP 发光试剂的稳定性能提高 2-5 倍。

4 发展以 ATP 放大为基础的测试技术

酶法的 ATP 循环通过用腺苷酸盐/多聚磷酸盐激酶在存在过量 AMP 和无机多聚磷酸盐时,允许放大 10 000 倍测试灵敏度。通过这种策略,能检测到 Attomolar ATP 的水平,这和细菌细胞 ATP 水平处于同一个数量级,这使得能检测到数量低至一个大肠杆菌(*Escherichia coli*)细菌形成单位,这种改变能精确检测细菌的污染^[25]。Tanaka 等提出了使用磷酸转移酶和无机磷酸盐用于 AMP 至 ADP 的转化,此方法不需要 ATP 起始反应,展示了较低的发光背景^[26]。大多数情况下,腺苷酸激酶(ADK)和丙酮酸激酶(PK)用于检测 ADP 和 AMP 转化到 ATP,然后由标准的生物发光法测定 ATP。Sakakibara 等描述了高灵敏度的 ATP 和 AMP 的检测程序^[27],使用丙酮酸磷酸二激酶(PPDK),通过 AMP 和焦磷酸盐转化为 ATP 增加检测灵敏度,这种焦磷酸盐在荧光素-荧光素酶反应中产生,试剂的背景值通过使用腺苷磷酸脱氨酶来降低。Schultz 等^[28]补充了一种存在大量 ATP 情况下测定 ADP 的相似方法,此种情况,内源的 ATP 通过添加 ATP-硫酸化酶水解除去,通过加热法使这种酶失活,此处 ADP 用 AK 转化为 ATP。Lee 等通过 AMP 和焦磷酸盐双重放大策略将检测灵敏度提高了 100 倍,检测限达 10^{-3} pmol/L ATP,线性检测范围在 10^{-3} -10 pmol/L ATP,在小于 30 min 的时间内对细菌的检测灵敏度由传统的大约 10^4 CFU 降至小于 10 CFU 的细菌数^[29]。

5 细胞 ATP 提取技术

细胞 ATP 提取方法很多,不同方法对发光强度值的影响不同^[30]。ATP 提取剂主要有以下要求:能快速杀死活细胞并使细胞膜破碎溶解;能使 ATP 水解酶或转化酶变性失活;能使细胞内的 ATP 充分释放到提取液中;不干扰或很少干扰虫荧光素-荧光素酶系统。为此一般推荐使用下列几类细胞 ATP 提取剂如:(1)缓冲液;(2)酸的稀释液和中和剂;(3)表面活性剂;(4)有机溶剂。特异的提取方法依赖细胞的类型,然而提取剂也影响 ATP 与荧光素和荧光素酶的反应,相应地降低荧光素酶的反应活力和方法的检测灵敏度。舒柏华等研究了不同浓度的 Triton X-100 和 Apyrase 混合液对体细胞 ATP 萃取及水解的效果,发现 TritonX-100 和 Apyrase 的最佳工作浓度分别为 0.15%、0.1%,此时对体细胞 ATP 有较充分的萃取和水解,而对细菌 ATP 基本不萃取,且对荧光素酶的抑制较小。同时他们的研究表明,三氯乙酸是一种较好的细胞 ATP 提取剂,其最佳工作浓度为 1.5%^[31]。Yang 等比较了高氯酸(HClO₄)、硼酸缓冲液/加热、去离子水等提取法对发光值的影响,发现煮沸的去离子水提取效果最好^[32]。Prioli 等也分别证实了通过加热缓冲液法提取细胞内 ATP 法检测细菌数量是一种可信度高的方法,与传统的琼脂培养法检测结果相关性良好^[33]。Akihiko 等的结果表明 TCA 和 TritonX-100 作为细胞 ATP 提取剂时其最佳工作浓度分别为 0.16%、0.5%,在使用 NaCl 和 ATP 提取剂(TCA 或 TritonX-100)时,DEAE-Dx 能显著增强发光,是一种有效的增强剂,且其浓度在 0.13% 时,发光增强达到最大^[34]。另外, Kamidate 等提出使用含磷脂酰胆碱和胆固醇脂质体可以用于这个目的,这些脂质体可以结合到氯化苯甲烃铵上形成阳离子的脂质体,从而达到减少阳离子表面活性剂抑制的目的^[35]。

6 常用的商业 ATP 生物发光试剂

常用的 ATP 生物发光试剂主要有: (1) Sigma Luciferase (来自萤火虫 *Photinus pyralis*), 商品号: L9506-BioUltra $\geq 98\%$ (SDS-PAGE), 使用 0.2 μg 萤火虫荧光素酶能检测到小于或相当于一飞摩尔 ATP (1×10^{-18} mol ATP)。 (2) 美国 Promega 公司的 ATP 检测试剂盒: CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay。 BacTiter-Glo[™] 试剂的基础有两点, 其一是一种受专利保护的热稳定萤光素酶(Ultra-Glo[™] 重组萤光素酶), 其二是从细菌中提取 ATP 的专利试剂配方。 (3) 日本的 KIKKOMAN 公司 Checklite HS SET 试剂盒, 其 Firefly Luciferase 为重组热稳定性酶, 配套 LuminotesterC-110, 可以检测最低 4×10^{-17} mol ATP, 其商品 LUC-T (CD: 61315)为热稳定性酶, LUC-H (CD: 61314)为抗阳离子洗涤剂的热稳定性酶, Rapid Hygiene Monitoring Systems 能用于检测食物污染或食物残留(包括有机物质)的检测, 以存在的 ATP 和 AMP 作为食品污染指示物。由 Kikkoman 发展的 LuciPac Pen/W kits 包含原始的荧光素酶和 PPKK, 与测试目标物上的 ATP 和 AMP 反应产生光, 发光水平通过发光仪可轻易测量到。 (4) 英国 Invitrogen detection technologies 公司的 Molecular Probes[™] A22066 ATP Determination Kit, 包括 D-Luciferin、重组的荧光素酶、Dithiothreitol (DTT)、Adenosine 5'-triphosphate (ATP)和 20 \times Reaction Buffer。 (5) 德国的 Roche 公司的 ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II 和 Assay Kit HS II 等。

国产的 ATP 生物发光试剂仍处于试制阶段, 没有大规模的应用。广东省微生物研究所和广东环凯微生物科技有限公司合作进行 ATP 生物发光技术和配套的发光试剂盒与发光检测仪的研制已经有十几年的历史了, 取得了较大的进展,

形成了一系列的知识产权(ZL200410051705.2, ZL200610034384.4, ZL200410026794.5, ZL200920265525.2, ZL200410026795.X, 200610034385.9 等), 完成了萤火虫荧光素酶的制备和 D-荧光素的化学合成, 已能合成高纯度的萤火虫荧光素, 其发光活力达到或超过 Sigma L9504, 研制的 ATP 生物发光试剂盒和发光检测仪与多联不锈钢样品预处理设备配套使用可以在各类水、饮料和相关食品中应用, 在不到 30 min 的时间内完成样品中细菌总数检测^[36-38]。

7 结语

ATP 生物发光法具有简便、快速等优点, 作为食品生产和流通过程中的微生物总数和清洁度快速检测的一种新方法, 近年来在国外倍受推崇, 在美、日等国已广泛应用。国际先进的 ATP 发光试剂制备技术中采用了许多先进技术, 其主要目的是提高检测灵敏度和稳定性或重复性, 使其适应不同应用要求的 ATP 快速检测; 另外, 发展具有更灵敏的自动化计算机程序的新型发光仪器是 ATP 生物发光检测配套技术研究的焦点。相对国际先进技术, 国产的 ATP 生物发光试剂、配套仪器和技术及应用面均有较大的拓展空间。发展高水平的国产 ATP 发光试剂的关键是通过基因工程技术克隆改造荧光素酶基因, 提高荧光素酶的发光比活力和热稳定性, 稳定酶蛋白及其发光特性, 同时在完善已有技术的基础上吸收国际先进技术, 进一步大幅度提高 ATP 发光试剂的检测灵敏度, 通过规模化生产降低发光检测试剂的成本, 使其能在食品及相关企业大规模推广应用。

参考文献

- [1] Roda A, Guardigli M, Michelini E, et al. Bioluminescence in analytical chemistry and in

- vivo* imaging[J]. *Trac Trends in Analytical Chemistry*, 2009, 28(3): 307–322.
- [2] Ahmandian A, Ehn M, Hober S. Pyrosequencing: history, biochemistry and future[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2006, 363: 83–94.
- [3] Tisi LC, White PJ, Squirrell DJ, et al. Development of a thermostable firefly luciferase[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2002, 457: 115–123.
- [4] Fujii H, Noda K, Asami Y, et al. Increase in bioluminescence intensity of firefly luciferase using genetic modification[J]. *Analytical Biochemistry*, 2007, 366(2): 131–136.
- [5] Branchini BR, Southworth TL, Khattak NF, et al. Red- and green-emitting firefly luciferase mutants for bioluminescent reporter applications[J]. *Analytical Biochemistry*, 2005, 345(1): 140–148.
- [6] 张菊梅, 吴清平, 周小燕, 等. 荧光素酶研究进展[J]. *微生物学通报*, 2001, 28(5): 98–101.
- [7] Viviani VR, Arnoldi FG, Brochetto-Braga M, et al. Cloning and characterization of the cDNA for the Brazilian *Cratomorphus distinctus* larval firefly luciferase: similarities with European *Lampyris noctiluca* and Asiatic *Pyrocoelia luciferases*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 2004, 139(2): 151–156.
- [8] Viviani VR, Arnoldi FGC, Neto AJS, et al. The structural origin and biological function of pH-sensitivity in firefly luciferases[J]. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 2008, 7: 159–169.
- [9] Oba Y, Ojika M, Inouye S. Firefly luciferase is a bifunctional enzyme: ATP-dependent monooxygenase and a long chain fatty acyl-CoA synthetase[J]. *FEBS Letters*, 2003, 540(1): 251–254.
- [10] Oba Y, Sato M, Ohta Y, et al. Identification of paralogous genes of firefly luciferase in the Japanese firefly, *Luciola cruciata*[J]. *Gene*, 2006, 368(1): 53–60.
- [11] Lee KS, Park HJ, Bae JS, et al. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the luciferase from the firefly, *Pyrocoelia rufa*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2001, 92(1): 9–19.
- [12] Michel P, Torkkeli T, Karp M, et al. Expression and purification of polyhistidine-tagged firefly luciferase in insect cells—a potential alternative for process scale-up[J]. *Journal of Biotechnology*, 2001, 85: 49–56.
- [13] Gomi K, Hirokawa K, Kajiyama N. Molecular cloning and expression of the cDNAs encoding luciferin-regenerating enzyme from *Luciola cruciata* and *Luciola lateralis*[J]. *Gene*, 2002, 294(1/2): 157–166.
- [14] Hattori N, Sakakibara T, Kajiyama N, et al. Enhanced microbial biomass assay using mutant luciferase[J]. *Analytical Biochemistry*, 2003, 319(2): 287–295.
- [15] Alipour BS, Hosseinkhani S, Nikkhan M, et al. Molecular cloning, sequence analysis, and expression of a cDNA encoding the luciferase from the glow-worm, *Lampyris turkestanicus*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 325(1): 215–222.
- [16] Branchini BR, Southworth TL, DeAngelis JP, et al. Luciferase from the Italian firefly *Luciola italica*: molecular cloning and expression[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 2006, 145(2): 159–167.
- [17] Goerke AR, Loening AM, Gambhir SS, et al. Cell-free metabolic engineering promotes high-level production of bioactive *Gaussia princeps* luciferase[J]. *Metabolic Engineering*, 2008, 10(3/4): 187–200.
- [18] Oba Y, Yoshida M, Shintani T, et al. Firefly luciferase genes from the subfamilies Psilocladinae and Otoretinae (Lampyridae, Coleoptera)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 2012, 161(2): 110–116.
- [19] Kim J, Moon CH, Jung S, et al. α -Synuclein enhances bioluminescent activity of firefly luciferase by facilitating luciferin localization[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 2009(1794): 309–314.
- [20] Branchini BR, Southworth TL, DeAngelis JP, et al. Luciferase from the Italian firefly *Luciola italica*: molecular cloning and expression[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 2006, 145(2): 159–167.
- [21] Mehrabi M, Hosseinkhani S, Ghobadi S.

- Stabilization of firefly luciferase against thermal stress by osmolytes[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2008, 143(2): 187–191.
- [22] Ganjalikhany M R, Ranjbar B, Hosseinkhani S, et al. Roles of trehalose and magnesium sulfate on structural and functional stability of firefly luciferase[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010, 62(2): 127–132.
- [23] Rodionova NS, Petushkov VN. Effect of different salts and detergents on luciferin-luciferase luminescence of the enchytraeid *Fridericia heliota*[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 2006, 83(2): 123–128.
- [24] Moroz NA, Gurskii DY, Ugarova NN. Stabilization of ATP reagents containing firefly *L. mingrelica* luciferase by polyols[J]. *Moscow University Chemistry Bulletin*, 2008, 63(2): 67–70.
- [25] Khlyntseva SV, Bazel YR, Vishnikin AB, et al. Methods for the determination of adenosine triphosphate and other adenine nucleotides[J]. *Journal of Analytical Chemistry*, 2009, 64(7): 657–673.
- [26] Tanaka S, Kuroda A, Kato J, et al. A sensitive method for detecting AMP by utilizing polyphosphate-dependent ATP regeneration and bioluminescence reactions[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2001, 9(3): 193–197.
- [27] Sakakibara T, Murakami S, Eisaki N, et al. An enzymatic cycling method using pyruvate orthophosphate dikinase and firefly luciferase for the simultaneous determination of ATP and AMP (RNA)[J]. *Analytical Biochemistry*, 1999, 268(1): 94–101.
- [28] Schultz V, Sussman I, Bokvist K, et al. Bioluminometric assay of ADP and ATP at high ATP/ADP ratios: assay of ADP after enzymatic removal of ATP[J]. *Analytical Biochemistry*, 1993, 215(2): 302–304.
- [29] Lee HJ, Ho MR, Tseng CS, et al. Exponential ATP amplification through simultaneous regeneration from AMP and pyrophosphate for luminescence detection of bacteria[J]. *Analytical Biochemistry*, 2011, 418(1): 19–23.
- [30] Kiesslich T, Oberdanner CB, Krammer B, et al. Fast and reliable determination of intracellular ATP from cells cultured in 96-well microplates[J]. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2003, 57(3): 247–251.
- [31] 舒柏华, 赵志耀, 徐顺清, 等. 利用生物发光分析技术快速检测微生物的方法学研究[J]. *发光学报*, 1999, 20(1): 77–80.
- [32] Yang NC, Ho WM, Chen YH, et al. A convenient one-step extraction of cellular ATP using boiling water for the luciferin-luciferase assay of ATP[J]. *Analytical Biochemistry*, 2002, 306(2): 323–327.
- [33] Prioli RP, Tanna A, Brown IN. Rapid methods for counting mycobacteria-comparison of methods for extraction of mycobacterial adenosine triphosphate (ATP) determined by firefly luciferase assay[J]. *Tubercle*, 1985, 66(2): 99–108.
- [34] Ishida A, Yoshikawa T, Nakazawa T, et al. Enhanced Firefly bioluminescence assay of ATP in the presence of ATP extractants by using diethylaminoethyl-dextran[J]. *Analytical Biochemistry*, 2002, 305(2): 236–241.
- [35] Kamidate T, Yanashita K, Tani H, et al. Firefly bioluminescent assay of ATP in the presence of ATP extractant by using liposomes[J]. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(1): 337–342.
- [36] Wu HQ, Wu QP, Zhang JM, et al. Study on rapid quantitative detection of total bacterial counts by the ATP-bioluminescence and application in probiotic products[J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2011, 46(5): 921–929.
- [37] 吴慧清, 李程思, 吴清平, 等. ATP 生物发光法饮用水中细菌总数快速测定方法研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2009, 19(9): 1975–1978.
- [38] 吴慧清, 吴清平, 张菊梅, 等. 生物发光检测法和国标法检测样品中活菌总数的比较研究[J]. *食品工业科技*, 2004(4): 134–135.