

# 利用先进的动态学分析方法监测细菌生长情况

Michel Hoogenkamp | Research Technician | Academic Centre for Dentistry Amsterdam (ACTA)  
Cathleen Salomo | Field Applications Scientist | Molecular Devices

## 前言

众所周知，如何消除致病菌一直是医院获得性感染的难题。目前，许多制药公司都在研发对抗这些耐药致病菌的有效化合物，而如何筛选和鉴定这些化合物的功效是微生物学家们面临的挑战。

在本篇文章中，我们使用 SoftMax®Pro7.0 (或更高版本) 数据采集和分析软件进行细菌生长曲线的检测。在连续的一段时间内，使用多任务流程编辑器可以同时采集细胞密度值和 GFP 荧光信号值。我们探讨了软件中各种数据转换模式，例如将 GFP 信号归一化为细胞密度，以及获取生长速率或其他动力学相关信息。

## 材料

- 含有质粒 pMV 158 - GFP 的粪肠球菌菌株 OG1RF
- 黑色 96 孔底透微孔板 (Greiner Bio - One 公司, # 655096)
- qPCR 密封膜 (Eurogentec 公司, # RT - OPSL)
- SpectraMax i3x 多功能微孔板读板机 (Molecular Devices 公司), 包括 SoftMax Pro 7.0 (或更高版本) 软件

## 方法

### 使用多任务流程编辑器采集数据

本篇文章中细菌生长的实验数据来自于荷兰牙科学术中心 (ACTA) 预防牙科的 SpectraMax®i3x 多功能微孔板读板机。在本次实验中，我们将含有质粒 pMV158 -

GFP 的粪肠球菌菌株 OG 1 RF 作为样品并且设置了 5 种不同的实验条件。GFP (绿色荧光蛋白) 表达是异源的，2015 年 Hoogenkamp 等人<sup>1</sup> 报道过 GFP 是可以作为粪肠球菌的活力标志物的。将 150 μl 的粪肠球菌样品和空白对照 PBS 依次加入黑色 96 孔底透微孔板中，为了防止液体蒸发，最好用 qPCR 密封膜覆盖微孔板。把微孔板放入 SpectraMax®i3x 多功能微孔板读板机中，设置孵育温度为 37°C，然后进行连续时间的动力学检测。

在 SoftMax Pro 软件多任务流程编辑器中，创建一个包含吸光度检测 (OD 600) 和荧光强度检测 (荧光底读) 的动力学循环程序，两次读数之间设置 5 秒钟的线性混匀 (见图 1)。600 nm (OD 600) 读取的吸光度值代表了细菌生长的密度，荧光底读所读取的 GFP 蛋白表达的荧光强度值代表了细菌活力，激发光设置在 485 nm (带宽 9 nm)，发射光设置在 515 nm (带宽 15 nm)。吸光度值和荧光强度值这两种数据分别单独记录在吸光度检测和荧光强度检测的程序中。此次动力学循环程序设定为每 15 分钟重复一次读数，一共持续 18 个小时。在 SoftMax Pro 7.0 (或更高版本) 软件中，允许暂停或恢复动力学读数，从而便于用户在程序运行期间向微孔板中添加试剂 (本次实验没有使用该功能)。最后，使用 SoftMax Pro 软件分析所得的双检测模式动力学数据。

## 优势

- 多任务流程编辑器，可同时检测细胞密度和荧光蛋白动态表达，节省时间；
- 软件内置动力学分析参数和自定义函数，简化数据分析流程；
- 轻松将数据以板格式或列表格式输出，并绘制散点图或条形图直观展示数据结果。

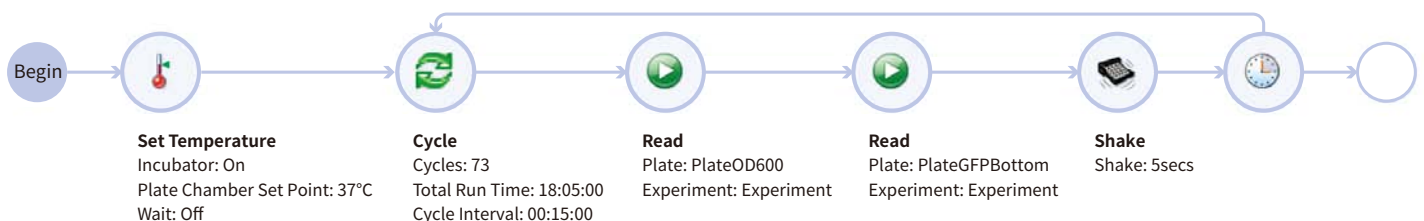


图 1 SoftMax Pro 7 多任务流程编辑器，用于双读取模式动态读数。鼠标拖放功能易于设置，可以快速设定用户自定义的实验流程

## 利用数据运算功能进行数据分析

作为实验数据处理的第一步，用户必须决定是否要减去空白。首先，在孔板编辑器中，定义空白孔的位置，有板空白和组空白两种选择，板空白是指整个微孔板只有一个空白对照，在每个时间点从板中所有样品孔的原始数据中减去板空白；而当对样品进行不同实验条件的分组，每组样品设置一个组内空白，仅从相对应组别的样品孔的原始数据中减去组空白。在本次实验中，采集缓冲液的背景值作为是否污染细菌或其它物质的对照。PBS 缓冲液不干扰 OD 600 或 GFP 测量，因此不需要减去。如果介质或缓冲液成分干扰 OD 600 或发出荧光，建议减去空白以测定吸光度或荧光通道的真实信号值。

通过数据处理菜单可设置先进的动态学数据分析。图 2 展示了细菌生长实验的数据分析设置，菜单分为两部分：原始数据设置和数据分析设置原始数据设置中包含了将动力学曲线的第一个数据点设置为零的选项。此外，减去空白的操作可以在动力学数据处理之前也可以在其之后。当选择了“处理前”选项，将会在每个时间点从所有样品孔的原始数据中减去空白孔的平均值；当选择了“处理后”选项，将从样品孔处理过的数据中再减去处理过后的空白孔平均值。

数据分析设置和数据输出类型包括以下选项 (图 2):

限值: 如果需要, 限值会限定数据分析中动力学数据的范围, 它可以为信号轴 (OD, RLU, RFU) 和/或时间轴 (秒) 限定范围, 对所有孔应用相同的分析范围 (图 2, 绿色框)。

波长选项: 在选定的限值范围内转换信号轴。默认选择测量的第一个波长 (命名为! Lm 1)。下面列举两个信号轴转换的例子:

(1) 标准化: 如果在同一个检测程序内读取了两条波长的数据, 则波长选项下拉菜单会列出预置的选项, 例如比率 (波长 1/波长 2=! Lm 1!/ Lm 2)。

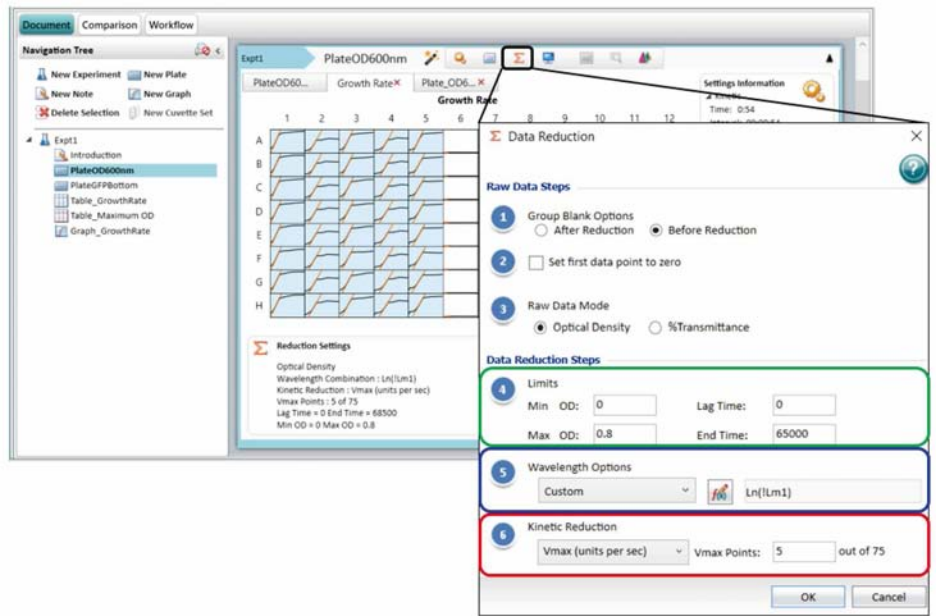


图 2 数据处理菜单中的数据分析选项。该示例展示了 OD 600 nm 的吸光度数据的对数转换，并将 Vmax 值降低到 5 个 Vmax 点，以测定曲线的最陡部分。

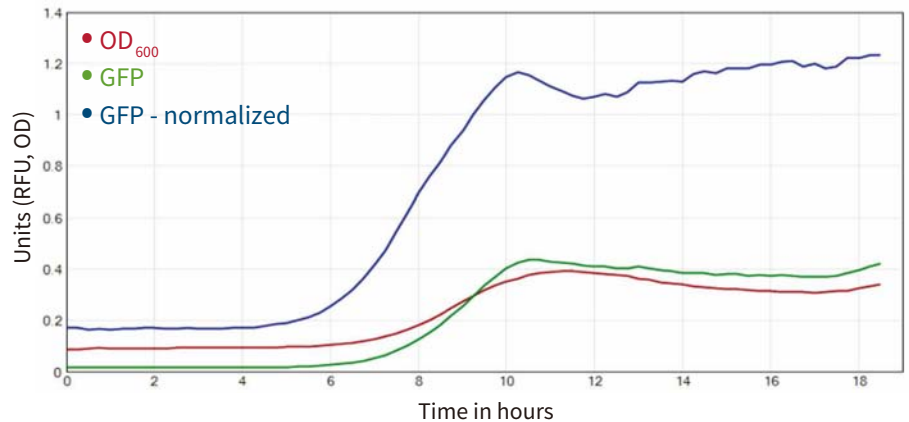


图 3 标准化为 OD 600 细胞密度的 GFP 信号。

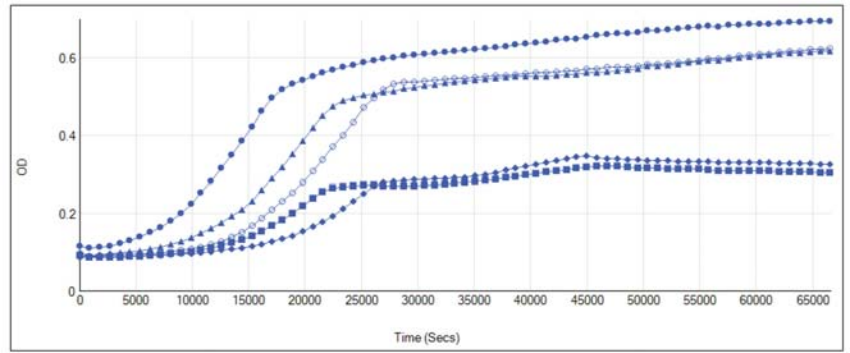
在本次实验的示例数据中，两组数据来自于两个独立的检测程序，因此比率信号归一化需要自定义公式。为了将 GFP 荧光信号标准化为细菌细胞密度，我们需要输入如下公式：

! KinPlot@PlateGFPBottom/! KinPlot@PlateOD600。可将此公式应用于两个检测程序中的任一个。公式! KinPlot 提取了用符号 '@' 引用的指定检测程序的动力学数据集以及相应的检测程序名称。原始数据与转换（标准化）数据的比较如图 3 所示。(2) 对数标度：为了使 OD 600 数据在指数增长阶段线性化，在吸光度检测程序中应用对数转换。通过输入 Ln(! Lm 1) 使用自然对数添加自定义公式，如图 2 所示（蓝色框）。原始数据与对数标度数据比较如图 4 所示。动力学分析：此选项进一步将每个动力学数据转变为一个简化的值，如 Vmax 最大斜率和开始时间。表 1 中是软件内置的动力学分析参数的完整列表和详细信息。

以上面提到的对数标度转换为例来详细说明动力学分析方法：

OD 600 原始数据转换成对数标度数据之后，可以通过设置 Vmax 来检测最大增长率，如图 2 所示（红色框）。Vmax 的内置分析选项方便了用户调整 Vmax 点，这些点定义了用于能确定斜率的线段的最大尺寸。Vmax 在对数标度曲线的图中显示为橙色线（图 4，对数标度曲线图例）。另外，在显示界面中处理数据选项里选择“Plot”，用户可以更好的比较板视图中所有孔的动力学分析数据。我们在 SoftMax Pro 7 软件孔板编辑器中将 5 种不同实验条件的样品进行分组 (A1 - A5)，

Raw data view



Reduced data view

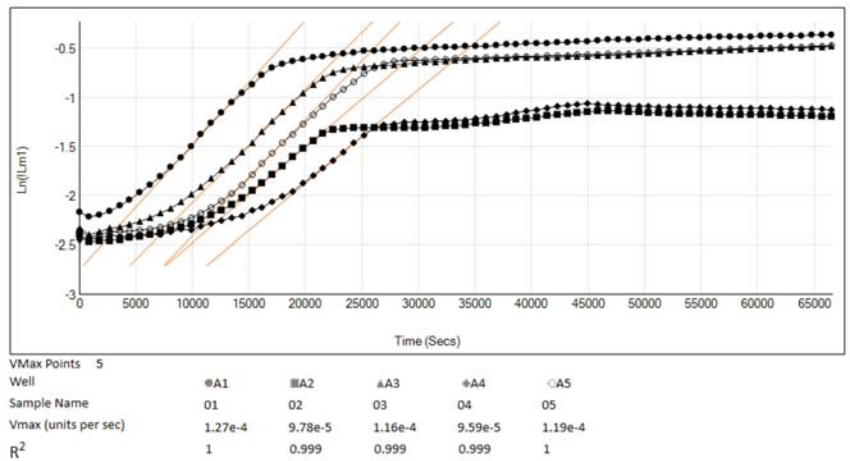


图 4 OD 600 原始数据曲线和转换过的对数标度曲线。A1 孔至 A5 孔设置了 5 种不同的实验条件。上图：OD 600 的动态原始数据曲线（蓝线），下图：对数标度数据曲线（黑线），并通过设置 Vmax 动态数据分析（橙色线）确定指数阶段的生长速率。相应的动态数据分析设置如图 2 所示。

Growth Condition	Vmax (units/second)	Growth rate (units/h)	Growth Rate StDev	Doubling time (h)
1	1.23e-4	0.443	0.016	1.564
2	9.73e-5	0.350	0.004	1.979
3	1.10e-4	0.396	0.015	1.749
4	9.21e-5	0.332	0.010	2.090
5	1.01e-4	0.364	0.031	1.906

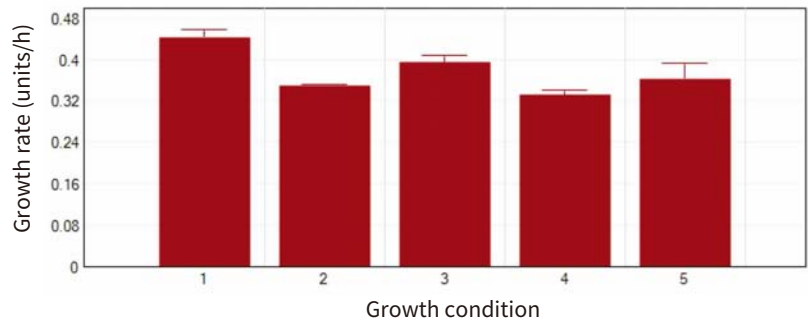


图 5 结果显示选项，选择显示分析过的数据结果。粪肠球菌每个实验组的数据结果 (A1-A5 列, n = 8) 显示在结果列表以及柱状图中。Vmax 可用于生长速率 ( $k = Vmax * 3600$ ) 和倍增时间 ( $g = \ln 2 / k$ ) 的运算。

这样用户能够更直观的比较这些不同实验组之间的数据,如图5(上图)所示,表格中显示了Vmax的数据,通过运算分析,还得到了生长速率(K)和倍增时间(g)。数据结果可以显示为柱状图(图5,下图),以便更直观的评估细菌的生长条件或药物的治疗效果。

## 结论

SoftMax Pro 7 多任务流程编辑器配合Molecular Devices SpectraMax i3x 多功能读板机一起使用,可同时读取吸光度值和荧光强度值,灵活的进行双检测模式的细菌生长曲线动力学实验。在SoftMax Pro 7 软件中,内置了各种数据分析选项和细菌生长数据的转换分析,如吸光度和荧光强度的标准化或对数标度调整等。软件中还预设了各种动力学分析的简化参数,包括最大斜率或起始时间等。动态数据输出可以选择板格式或者列表格式输出,还可将数据绘制成更直观的条形图或者散点图,方便用户对不同实验条件的最终分析结果的评估。

## 参考文献

1. Hoogenkamp MA, Crielaard W, Krom BP. Uses and limitations of green fluorescent protein as a viability marker in *Enterococcus faecalis*: An observational investigation. *J. Microbiol. Methods* (2015) Aug;115:57-63.

动力学分析参数	描述
Vmax	动力学曲线的最大斜率,以毫单位/分钟或单位/秒作为单位。Vmax点的数量定义了用于能确定斜率的线段的最大尺寸。
Time to Vmax	达到Vmax的时间数据对于包括凝固化学在内的应用非常有用,其中试剂浓度的变化不会改变Vmax,而是改变反应达到最大速率的时间。
Slope	与Vmax(单位/秒)相同,使用分析限制范围内的所有可用的数据点来确定斜率。
Onset time	起始时间是分析非线性动力学反应的方法。起始时间指的使动态反应达到指定OD或RFU/RLU所需的时间(起始OD/RFU/RLU)。可用于级联反应,例如内毒素测试中的凝胶形成。
Time at minimum or maximum	此参数指的是达到分析限制范围内的最小或最大OD,RFU/RLU或%T的时间
Time at 1/2 maximum	此参数指的是达到分析限制范围内的最大OD,RFU/RLU或%T的一半数值的时间
Area under curve	此参数是估算由分析限制范围内的数据图定义的曲线下面积。数据图被视为一系列梯形,由连续的数据点及在X-轴的坐标围成的梯形,然后计算每个梯形定义的面积并求和。
Minimum or maximum	此参数指的是在分析限制范围内的最小OD,RFU/RLU或%T
Max-Min	此参数是从在分析限制范围内的最大OD,RFU/RLU或%T中减去最小值
Mean	此参数是在分析限制范围内的OD,RFU/RLU或%T的平均值

表1 软件内置的动力学分析参数



更多精彩内容  
尽在官方微信

## 美谷分子仪器(上海)有限公司

全国咨询服务热线: 400-820-3586  
上海 电话: 86-21-3372 1088  
北京 电话: 86-10-6410 8669  
成都 电话: 86-28-6558 8820  
台北 电话: 886-2-2656 7585  
香港

www.MolecularDevices.com.cn Email: info.china@moldev.com  
传真: 86-21-3372 1066  
传真: 86-10-6410 8601  
传真: 86-28-6558 8831  
传真: 886-2-2894 8267  
传真: 852-2289 5385

地址: 上海市长宁区福泉北路518号1座501室 200335  
地址: 北京市朝阳区广渠东路3号中水电国际大厦612 & 613室 100124  
地址: 成都市锦江区东御街18号百扬大厦2208室 610016  
地址: 台北市内湖区堤顶大道二段89号3楼  
地址: 香港中环皇后大道中15号置地广场 公爵大厦21楼

