

利用SpectraMax注射器卡盒先进的“智能注射”技术助你实现高灵敏ATP定量检测

简介:

活细胞内含有大量的5'腺苷三磷酸(ATP), 已知其在细胞内含量受到严格调控, 我们可以利用这个调控机制来检测活细胞数目, 通过对ATP含量的检测可反映出食品、药品、保健品以及个人护理品的生产过程中原料和工厂环境中细菌污染的情况, 此方法也可用于废水中细菌含量的检测。在生物技术和制药工业领域中, 通过检测ATP含量来评价细胞增殖和毒性情况。生物化学发光检测ATP试验由于其自身高灵敏度和操作简便性等优势, 目前是非常流行检测手段。在此篇应用中, 我们利用SpectraMaxi 3x多功能微孔板读板机具有的SpectraMax注射器卡盒的智能注射技术展现出检测结果的具有更高的灵敏度(20amol/孔)和更宽的动力学范围(5个数量级)。

试验原理:

此试验反应的基本原理是利用来自于北美最常见的萤火虫荧光素被萤火虫荧光素酶催化后发光。此催化反应过程如图一所示, 伴随着ATP和氧气的存在下才会产生荧光信号。当反应过程中ATP含量有限时, 发光强度会与ATP浓度呈现正相关性, 发射光的强度可以由SpectraMaxi 3x多功能微孔板读板机进行检测, 在此试验过程中我们可以利用SpectraMax注射器卡盒精确的加入试剂, 调整检测和延迟时间以获得最佳检测灵敏度。

材料和方法:

- ENLITEN ATP 检测试剂盒 (Promega cat. #FF2000)
- 全白色96孔板 (Greiner cat. #655075)
- SpectraMax i3x多功能微孔板读板机
 - SpectraMax注射器卡盒

试验设置:

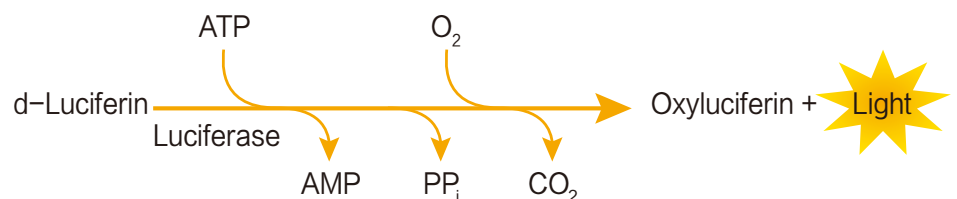
仪器工具包附带的说明(技术手册Part#TMF004)做了稍微修改适合96孔板。

注释: 除了如何从微生物或哺乳动物细胞组织中提取ATP流程之外, 技术手册中的一节内容包括了样品的制备过程。

- 1: 将酶和缓冲液解冻后置于冰上, 将缓冲液加入rL/L(海肾荧光素/萤火虫荧光素)试剂瓶中后, 轻轻混匀若干次后置于室温环境内一小时。
- 2: 确定检测灵敏度和动力学范围, 将100μl的ATP储存液稀释于900μl不含ATP水中, 按照1/10比率进行梯度稀释, 后续用于制备标准品曲线, 标准品浓度(10nM至0.0001nM), 然后放置冰上待用。

优势:

- 智能注射技术助你同时完成试剂的混匀以及加样
- ATP检测灵敏度低至20amol/孔
- 动力学范围可达5个数量级



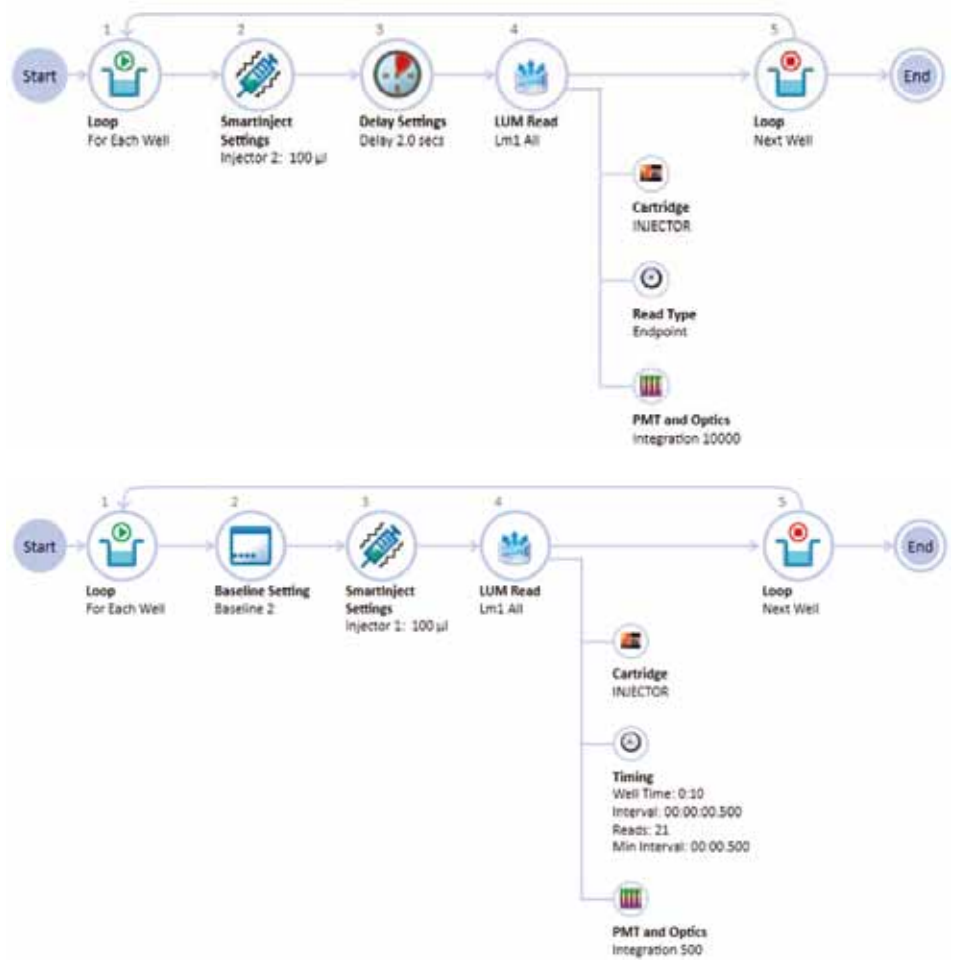
图一: 萤火虫荧光素酶催化反应过程

3: 按照10 μ l/孔量将稀释的ATP标准品(不含ATP水作为空白对照)加入微孔板中, 每个标准品设置三个复孔, ATP浓度范围从0.01 fmol/孔至1000fmol/孔。

仪器设置:

如图二所示, 仪器的设置可以利用SoftMax Pro软件全新图形化的工作流程界面快速完成。SoftMax Pro软件库内置140多检测模板, 其中也包含有ATP试验模板。智能注射技术的应用可以在加入试剂同时进行震荡混匀用于保证加样体系均匀性。

- 1: 进行快速动力学试验检测时最好设置为终点检测法, 选择智能注射技术将100 μ l rL/L试剂加入预先含有10 μ l ATP的孔内, 然后间隔0.5秒时间检测一次, 整孔检测时间为10秒。
- 2: 进行终点法检测试验来确定灵敏度和动态学范围, 每孔中加入100 μ l试剂后延迟2秒钟, 然后检测时间10分钟。
- 3: 点击仪器控制面板的预冲选项后, 将rL/L试剂预冲于注射器1内, 仅需要260 μ l试剂就可以预冲满整个管路。
- 4: 将包含ATP标准品的微孔板放入SpectraMax i3x读板机微孔板托架上, 然后点击读取按键进行注射/检测循环过程。

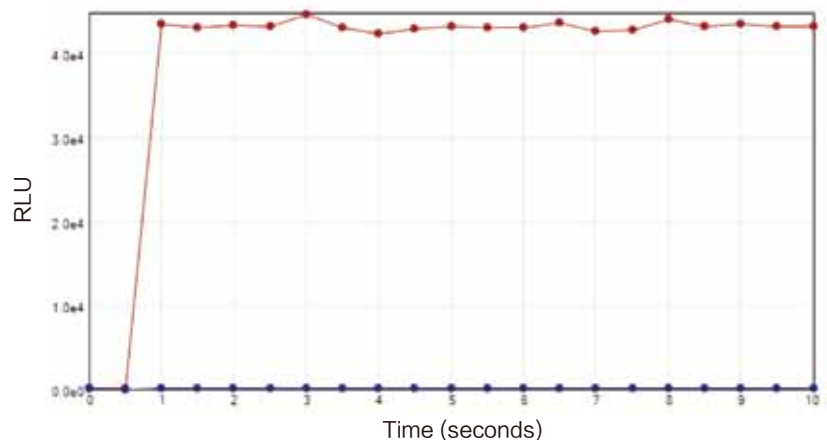


图二: SoftMax Pro软件中加样流程, 上图检测流程所示为终点法试验, 加样100 μ l, 延迟2秒, 检测10秒(10,000毫秒), 可以针对每个孔进行整个循环过程。下图: 检测流程所示为动力学试验并且进行2秒基线检测, 动态学检测时间为10秒并且每隔0.5秒时间检测0.5秒(500ms)数据, 智能注射技术可以在加样的同时进行微孔板的震荡, 可更好的进行样品混匀。

清洗注射器

如果想获得比较满意的ATP检测结果, 去污剂注射方式在整个检测体系中扮演着重要的角色, 已知单独用酒精冲洗是不够的。不仅仅因为必须保证整个系统无菌环境而且要保证整个系统内无ATP残留, 这样才能保证空白孔的检测值尽可能的低。

仪器触屏的清洗界面所有可设置的参数都是为了实现更快、更方便的清洗要求。1号注射器清洗和消毒过程首先至少需要泵入250 μ l 50%的去污剂(2.5%–3%的次氯酸钠), 去污剂充满管路里等待一个小时, 随后需要2.5ml去离子水再次清洗一次, 最后需要泵入至少250 μ l 75%酒精, 管路里充满酒精后等待一个小时。最后, 注射器管路里打入空气便于清空所有液体。



图三: ATP反应过程中加入萤火虫荧光素/萤火虫荧光素酶试剂, 如图所示每孔内含有1000fmol ATP (红色曲线) 或者仅含有去离子水 (蓝色曲线), 二者基线部分读取时间间隔为0.5秒, 数据分析和绘图通过SoftMax Pro软件的图表功能完成, 在注射器加入试剂后第二秒钟信号强度达到最大, 而且通过动态学检测法得知信号强度可维持10秒钟左右, 再加入去离子水孔内没有检测到任何信号值。

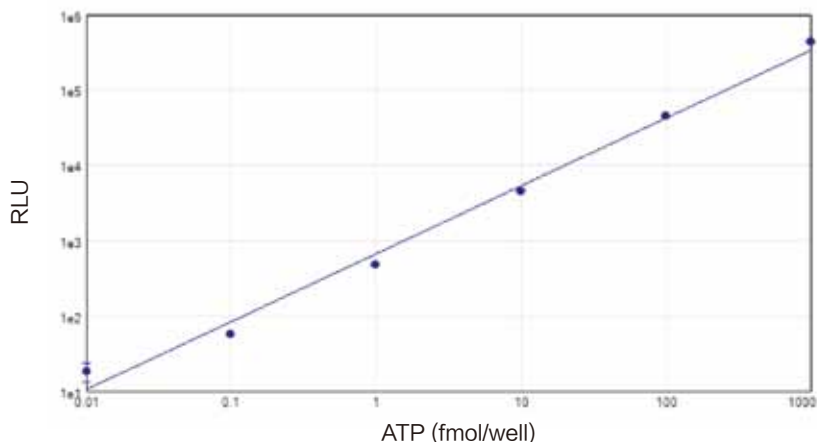
结果

ATP反应过程

萤火虫荧光素/萤火虫荧光素酶试剂反应过程如图三所示，当每孔内ATP含量达1000fmol时发光过程在1秒内达到最大化，而且持续时间大约为10秒钟(上部曲线)，空白对照孔(下部曲线)基本上没有任何信号产生。基于这些数据我们可以看出，等待两秒钟再进行检测时间是足够的，检测时间可以缩短至1秒钟即可，这样优化后可以大幅度降低整板检测的时间。

动态学检测范围和灵敏度

如图四所示，标准曲线ATP浓度范围从0.01fmol/孔至1000fmol/孔。检测下限(即空白孔产生的信号强度高于零孔值3倍标准偏差的值)，大约为20amol/孔，动态学范围5个数量级。



图四：我们利用具有SpectraMax注射器卡盒的SpectraMax i3x微孔板读板机检测96孔板时，软件绘制出ATP浓度曲线。标准品做了4个重复，曲线图表的绘制和结果的分析通过SoftMax Pro软件完成，动态学范围可达5个数量级，R2为0.991。

总结

当我们使用具有SpectraMax注射器卡盒的SpectraMax i3x微孔板读板机和ENLITEN ATP试剂进行相应实验时，ATP检测灵敏度达到20amol/孔，动态学检测范围可以达到5个数量级。达到如此高灵敏度情况下可以保证用户针对食品、饮料、化妆品或其他产品中的微生物污染情况进行相应检测。

通过SoftMax Pro软件内置模板使得试验设置流程快速、简便，可以分析样品数据结果并自动绘制标准曲线，软件全新的设置流程界面可以更加方便用户进行相应操作。智能注射技术可以在加样的同时进行液体的混匀，保证了反应体系均一性，优化试验过程以便于获得最佳化学发光信号值，降低空间差异。

参考文献

1. Jones, D. 1998. Bioluminescence assays using ATP. *Luminescence Forum*, 4: 1-9.
2. DeLuca, M.A. and W.D. McElroy, (1978) in *Meth. Enzymol.*, 53:3.
3. Promega Corporation: www.promega.com



扫一扫关注我们
的官方微信