

如何利用非连续动态学方法进行长时间细胞检测

简介

很多生物学实验涉及到长时间监测(几小时、几天甚至几周)细胞生长或酶促反应的变化,但是有许多模式生物无法长时间放置在微孔板中进行实时检测。比如藻类,生长需要周期性的光照和很高的湿度,而往往实验又要监测几周的生长状况。长时间动态监测还可以研究酶动力学、细胞信号传导和蛋白表达等生物学现象。然而,如果长时间不间断的检测放置于微孔板中的生物样品就会一直占用酶标仪几天时间,降低了实验室的仪器使用效率,此外,我们必须每隔一段时间按终点法的方式检测一次,多次检测的数值经手动方式进行处理后形成一个时间序列数据,以这种方式就实现了长时间动态学监测。

现在利用Molecular Devices公司酶标的SoftMax® Pro软件,您可以在做长时间检测时设置“暂停”和“恢复”功能(见图1)。这个功能方便您在进行长时间实验中,将微孔板取出进行加药处理或其它实验的检测,然后再将微孔板放回仪器内继续之前的长时间监测实验,并且所有数据将会自动以时间序列进行排列。

本篇应用文章,我们将介绍如何在SpectraMax® iD3多功能酶标仪上应用非连续的读值方法,在600nm波长下检测细菌在24小时的生长情况。

材料

- 96孔透明塑料板, (Greiner cat. # 651101)
- BactoBeads™ E. coli GFP宿主, (Edvotek cat. #728)
- LB培养基, (LB, Sigma Aldrich cat. #L2542)
- 氨苄霉素, (Sigma Aldrich cat. #A0166-5G)
- SpectraMax iD3多功能酶标仪, (Molecular Devices cat. #iD3)

方法

OD600值为0.32的氨苄霉素抗性的E.coli大肠杆菌储存液被10倍、100倍和1000倍稀释到10mL含100 µg/mL氨苄霉素的LB培养基中。在24小时内,周期性的分别从各个稀释组中取出100µL大肠杆菌培养基放置于96孔板中,用SpectraMax iD3酶标仪和SoftMax Pro软件检测600nm处的吸光度值。仪器设置参数(见表1)。

优势

- 无需长时间占用仪器就可实现动态监测实验,提高仪器使用效率
- 可自动将多次实验数据整合在一起形成动态序列曲线
- 利用SoftMax Pro软件比较在不同生长条件下的检测结果



图1. 非连续动态学分析,在软件界面的“Control and Status”点击“Interrupt”,可以暂停动态学监测,点击“Append”按钮可以恢复动态学监测。

动态学检测起始时间点为0，在软件界面的“Control and Status”点击“Interrupt”，仪器将检测完所有的孔后暂停读值，此时就可以将微孔板取出，到下一个读值的时间点时，将微孔板放回机器，设置参数进行检测，点击“Append”按钮就可将此次数据添加到第一次时间点的数据中形成完整的数据(见图1)。Append功能可以将间断读取的数据整合到一起生成一个连续的细菌生长曲线。软件可以根据细菌生长条件自动获得到达某个OD值浓度的时间，软件就会计算出细菌生长曲线在拐点的斜率等参数(见表2)。

Read mode settings	
Read mode	Absorbance
Read type	Kinetic
Wavelength	600 nm
Timing	1 reading/minute for 10 minutes

表1. 细菌生长曲线检测的酶标仪设置参数。

Bacterial dilution	Onset time (minutes)	Slope at inflection point
10-fold	1022	1.93E-05
100-fold	1118	2.24E-05
1000-fold	1175	2.46E-05

表2. 细菌生长曲线的多种参数。SoftMax Pro软件可以计算细菌生长的不同时期曲线面积值，当菌液OD600达到0.6时被定义为到达时间。

结果

细菌的生长曲线有四个期：迟缓期、对数期、稳定期和衰亡期(见图二)。我们检测了三个浓度的细菌培养基(如方法中所述)在不同时间点细菌浓度的数据形成了生长曲线(见图3)。图中显示不同浓度的细菌培养体系处于迟缓期、对数期和稳定期的时间有差异。图中没有显示出衰亡期，因为光散射测光度的方法是检测的颗粒物浓度并非细胞个体，死亡的细胞依然存在于培养基中形成颗粒，影响光散射，即影响OD600读值。

SoftMax Pro软件可以计算出细胞生长相关的多种参数。当细菌培养液达到一定的光密度时就可开始计算并比较生长起始时间。在此次实验中，我们观察到10倍稀释组最早进入生长期(见表2)。我们的预计就是稀释倍数最少的实验组最先进入生长期，实验数据结果证实了这个假设。生长曲线上拐点处的斜率也可以通过软件计算出来，这个参数反映出了指数增长(见表2)。

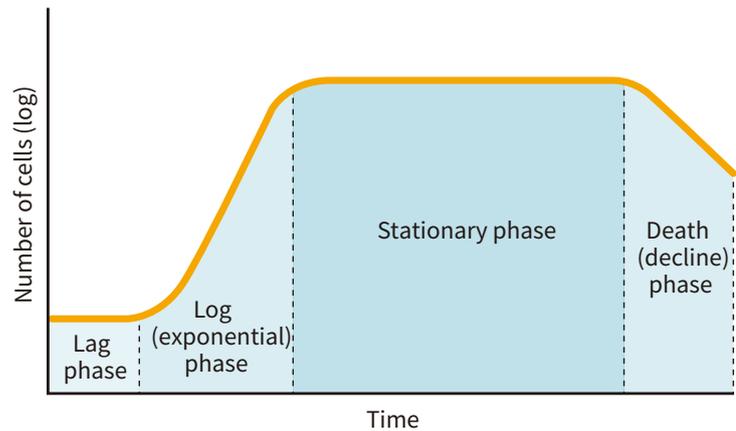


图2. 细菌生长周期，图中显示了细菌生长的四个时期。

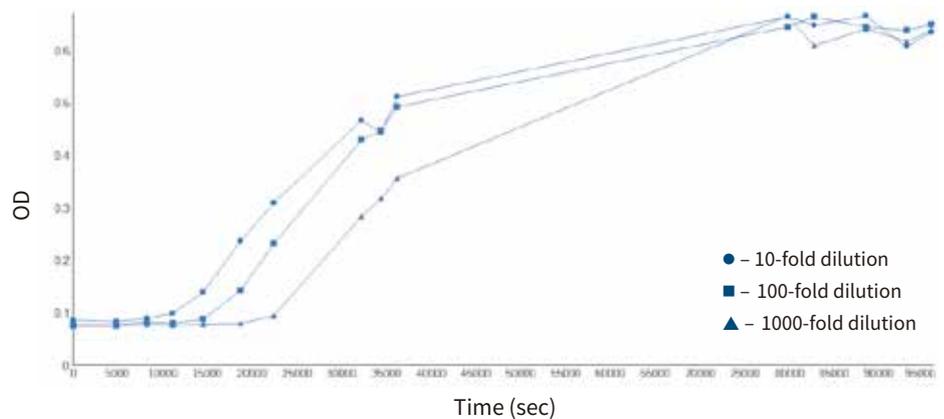


图3. 细菌生长曲线。应用Molecular Devices公司的酶标仪和SoftMax® Pro软件非连续动态监测不同稀释度的菌液浓度24小时，不同时间点数据可以整合在一组数据中形成动态序列。

结论

研究细胞生长的实验监测的时间差异很大，但是连续观测一块板子的样品数小时甚至数天不太现实。应用SoftMax Pro软件非连续动态监测功能，我们可以在不用长时间占用仪器的前提下得到动态监测的数据。此外，有些敏感细胞需要特殊的生长条件，非连续监测方法避免了生长环境不适而造成的对细胞的伤害。另外，SoftMax Pro软件的多种分析功能能够满足不同生长曲线的计算要求。关于计算公式的编辑方法可以在我公司的网站上找到 (<http://mdc.custhelp.com/>)，或联系技术支持。

参考文献

1. Watanabe, Mariyo F., and Shinshi Oishi. "Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions." *Applied and Environmental Microbiology* 49.5 (1985): 1342-1344.
2. Zwietering, M. H., et al. "Modeling of the bacterial growth curve." *Applied and Environmental Microbiology* 56.6 (1990): 1875-1881.
3. Sutton, Scott. "Measurement of microbial cells by optical density." *Journal of Validation Technology* 17.1 (2011): 46.
4. Maier, Raina M. "Bacterial Growth." *Environmental Microbiology*. Edition 3. 37-54. Elsevier Inc. Web. 2009.



扫一扫关注我
们的官方微信

Molecular Devices 大中华区

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 电话: 852-2248 6000

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: 852-2248 6011

www.MolecularDevices.com.cn

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: 香港皇后大道东1号太古广场三座4楼 406-9

