

本说明书用于产品 G8230, G8231, G8232 和 G8233。

所有的技术文献均可从公司网站 www.promega.com 得到

请访问公司网站以核准您所使用的技术手册为最新版本

I. 描述	1
II. 产品组成	4
III. 进行 BacTiter-Glo™ 检测的操作指南.....	5
A. 试剂制备.....	5
B. 检测细菌中 ATP 的操作方法.....	5
C. 制作 ATP 标准曲线(选做)的操作方法.....	5
. 附录.....	6
A. BacTiter-Glo™ 检测概述.....	6
B. 更多的考虑.....	6
C. BacTiter-Glo™ 检测应用举例.....	8
熟练使用者的操作指南.....	10

I. 描述

BacTiter-Glo™ 微生物细胞活性检测系统用均质的方法，依据对所存在的 ATP 的定量结果，确定培养物中活细胞的数目。ATP 是具有代谢活性的细胞的指示物。BacTiter-Glo™ 的设计既可以用于单管检测，也可用于多孔板形式的高通量筛选 (HTS)。均质的检测步骤意味着只需要直接向培养在培养基中的细菌细胞中加入一次试剂 (BacTiter-Glo™ 试剂)，然后测量荧光即可 (图 1)。不需要洗涤细胞，去除培养基，进行多次移液步骤等。

独特的试剂配方既可裂解细菌细胞，又可产生荧光信号，并支持这种“加入，混合，测量”的均质检测格式。荧光信号与存在的 ATP 量成正比，而 ATP 与存在于培养基中的细胞数目直接成正比 (图 2)。BacTiter-Glo™ 试剂的基础有两点，其一是一种受专利保护的热稳定荧光素酶 (Ultra-Glo™ 重组荧光素酶) 的性质，其二是从细菌中提取 ATP 的专利试剂配方。BacTiter-Glo™ 检测产生“辉光型”荧光信号，由图 3 所示的荧光素酶反应产生，其信号半衰期随菌株和培养基而不同，一般超过 30 分钟。数据表明这个检测可用于不同的细菌，酵母和真菌 (表 1)。由于是均质检测格式，所以减少了其它 ATP 测量方法由于需要多个步骤而可能带来的移液错误。

优点

- 简化您的检测：加入、混合、测量方案将操作步骤减少到少于其它类似的 ATP 检测的数目，不需进样器。
- 很快得到结果：加入、混合试剂 5 分钟之后就能记录数据。由于灵敏度高，可以更早地检测到生长。
- 提高灵敏度：可以从少至 10 个细菌细胞中测量到 ATP。
- 自由选择形式：可用于各种多孔板，也可用于单管；可用荧光发光计，也可用 CCD 相机记录数据。
- 获得皮实的信号：荧光信号稳定，半衰期 30 分钟。

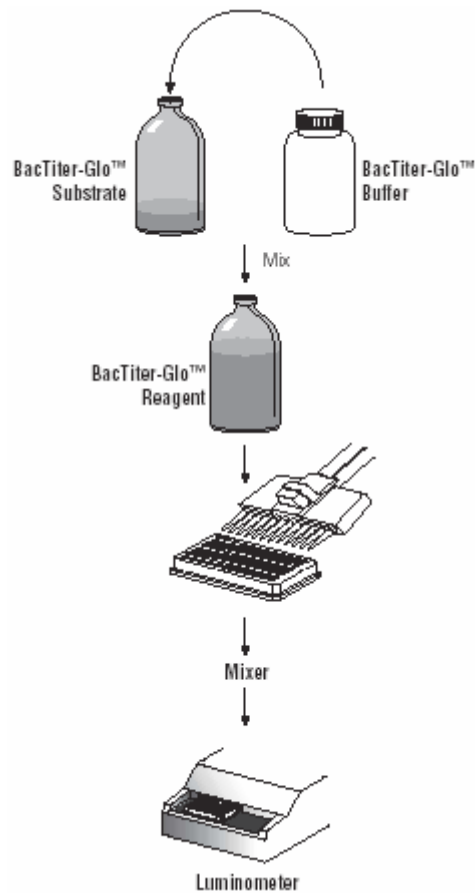


图 1. BacTiter-Glo™ 微生物细胞活性检测操作过程概览。这里显示的检测既适合单管，也适合多孔板。

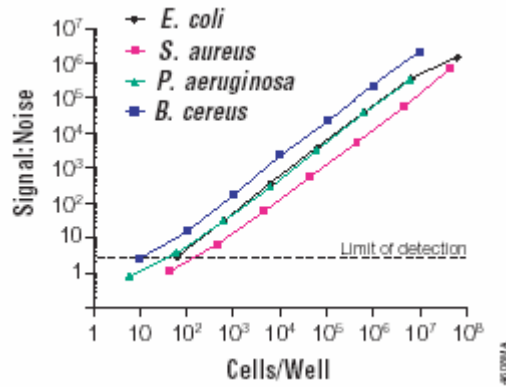


图 2. 细菌细胞数与荧光信号互相关联。四个细菌株，分别是大肠杆菌（ATCC25922），金黄色葡萄球菌（ATCC25923），铜绿假单胞菌（ATCC27853）和蜡状芽孢杆菌（ATCC10987），培养于 Mueller Hinton II (MH II) 肉汤（BD 目录号#297963；见第 IV 部分生长培养基推荐），并于 37°C 过夜。过夜培养物在 MH II 肉汤中稀释 50 倍，然后孵育几小时达到对数期。样品培养物用 MH II 肉汤在 96 孔板上进行系列稀释。按照操作手册第 III 部分进行检测。配好的 BacTiter-Glo™ 试剂在室温平衡 1.5 小时，以获得更好的灵敏度（见第 IV 部分试剂背景）。用 Turner Biosystems 公司的 Veritas™ 微孔板荧光发光计（目录号# E6501）记录荧光。信号代表每一个测量的三次平均读数。细菌细胞数目由计数 Luria-Bertani 琼脂板上的菌落形成单位来确定。信噪比由下式计算：信：噪=[信号平均值-背景平均值]/背景的标准偏差。在超过 5 个数量级的宽度内，荧光信号与细胞数量呈线性关系。从这个实验得到的检测极限对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和蜡状芽孢杆菌分别大约为：40、150、70 和 10 个细胞。

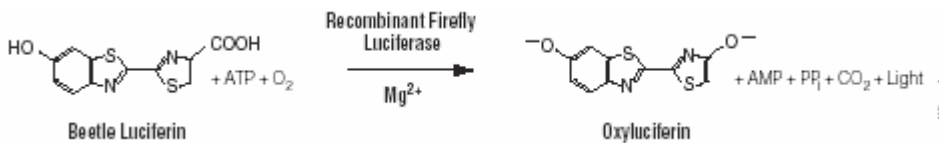


图 3. 萤光素酶反应。在 Mg^{2+} 、ATP 和分子氧存在时，萤光素的单氧合作用由萤光素酶催化。

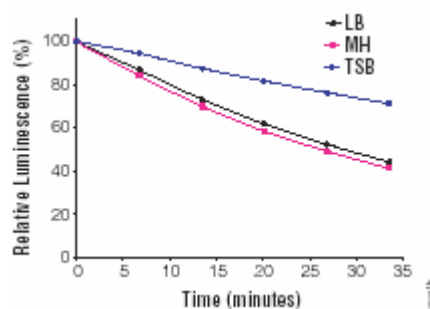


图 4. BacTiter-Glo™ 试剂产生辉光型萤光信号。大肠杆菌细胞的生长和检测同图 2 所述。测试了三种培养基：Luria-Bertani 肉汤，Mueller Hinton II (MH II) 肉汤（BD 目录号#297963）和 Trypticase Soy 肉汤（TSB, BD 目录号#299113）。大约有 10^6 个大肠杆菌细胞被用于检测。整个过程中萤光信号的稳定性被监控。萤光由 Turner Biosystems 公司的 Veritas™ 微孔板荧光发光计（目录号# E6501）记录。萤光信号的半衰期在 MH II，LB 和 TSB 中分别是 26，28，和 68 分钟。

II. 产品组成

产品	包装	目录号
BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay	10ml	G8230

限实验室使用。

底物足够进行 96 孔板上每孔 100µl 的 100 孔检测，或 384 孔板上每孔 25µl 的 400 次检测。包括：

- 10ml BacTiter-Glo™ Buffer
- 1 瓶 BacTiter-Glo™ Substrate (冻干粉)
- 1 操作手册

产品	包装	目录号
BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay	10X10ml	G8231

限实验室使用。每瓶底物足够进行 96 孔板上每孔 100µl 的 100 孔检测，或 384 孔板上每孔 25µl 的 400 次检测。包括：

- 10X10ml BacTiter-Glo™ Buffer
- 10 瓶 BacTiter-Glo™ Substrate (冻干粉)
- 1 操作手册

产品	包装	目录号
BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay	100ml	G8232

限实验室使用。底物足够进行 96 孔板上每孔 100µl 的 1,000 孔检测，或 384 孔板上每孔 25µl 的 4,000 次检测。

- 10 x 100ml BacTiter-Glo™ Buffer
- 10 瓶 BacTiter-Glo™ Substrate (冻干粉)
- 1 操作手册

产品	包装	目录号
BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay	10x100ml	G8233

限实验室使用。每瓶底物足够进行 96 孔板上每孔 100µl 的 1,000 孔检测，或 384 孔板上每孔 25µl 的 4,000 次检测（10,000 到 40,000 总检测）。包括：

- 10 x 100ml BacTiter-Glo™ Buffer
- 10 瓶 BacTiter-Glo™ Substrate (冻干粉)
- 1 操作手册

储存条件：要长期储存，冻干粉的 BacTiter-Glo™ 底物和 BacTiter-Glo™ 缓冲液应储存在 -20°C。未开封的 BacTiter-Glo™ 底物和缓冲液在 -20°C 可稳定 6 个月。若要经常使用，BacTiter-Glo™ 缓冲液可以存在 4°C 或存于室温 48 小时不会失掉活性。

要得到最佳性能，混合好的 BacTiter-Glo™ 试剂（缓冲液加底物）在室温存放时，应在 8 小时之内使用。混合好的 BacTiter-Glo™ 试剂可在 4°C 存 4 天，在 -20°C 存一星期或 -70°C 存一个月，活性丧失小于 20%。

III. 进行 BacTiter-Glo™ 检测的操作指南

由使用者准备的材料

- 不透明壁多孔板
- 多道移液器或自动移液器
- 摇板机或其它能混合多孔板内容物的仪器
- 荧光发光计（例如，Veritas™ 微孔板荧光发光计（目录号# E6501）或 Turner TD 20/20 荧光发光计（目录号# E2041, E2051）或能够读微孔板的 CCD 照相机。
- 自选：制作标准曲线的 ATP

A. 试剂制备

1. 融化 BacTiter-Glo™ 缓冲液，使用前在室温平衡。为方便起见，在使用前 48 小时融化 BacTiter-Glo™ 缓冲液并在室温保存。
2. 在使用前将冻干粉 BacTiter-Glo™ 底物在室温平衡。
3. 将适当体积（目录号#G8230, G8231 取 10ml, 目录号#G8232, G8233 取 100ml）的 BacTiter-Glo™ 缓冲液转移到装有 BacTiter-Glo™ 底物的安瓿瓶中，溶解冻干粉状的酶/底物混合物。这就形成了 BacTiter-Glo™ 试剂。
4. 轻轻震荡混合，摇晃或上下颠倒小瓶使溶液均一。BacTiter-Glo™ 底物应在 1 分钟内很容易地完全溶解。
5. 将试剂在室温平衡至少 15 分钟。

B. 从细菌中测量 ATP 的操作过程指南

注意：所有步骤均在室温下（22°C-25°C）完成。

1. 在一块孔壁不透明的多孔板上培养好微生物细胞（带培养基）（例如，100μl/孔在 96 孔板或 25μl/孔在 384 孔板上）。
2. 准备只含培养基不含细胞的对照孔，以得到背景荧光值。
3. 将平板及其内容物平衡到室温。
4. 向每孔中加入与细胞培养基相等体积的 BacTiter-Glo™ 试剂（如向 96 孔板内含 100μl/孔的培养基中添加 100μl 试剂，向 384 孔板内添加 25μl 试剂）。
5. 在一个定轨振荡器上混合内容物，并孵育 5 分钟。
6. 记录荧光强度。

C. 做出 ATP 标准曲线的方法（自选）

注意：所有步骤均在室温下（22-25°C）完成。

1. 在培养基中配制 1μM ATP（100μl 的 1μM ATP 含 10-10 摩尔 ATP）。
2. 在培养基中对 ATP 进行 10 倍系列稀释（1μM 到 10pM；100μl 体积将含有 10⁻¹⁰ 到 10⁻¹⁵ 摩尔的 ATP）。

！小心。

...皮肤含有 ATP。由于这个检测非常灵敏，我们建议戴上手套以避免污染。

！平衡

...试剂要在室温至少 15 分钟。为了得到最高的灵敏度，可能需要更长的平衡时间。更多的信息见第 IV.B 部分“试剂背景”。

3. 在多孔板上 100 μ l 培养基内制备不同浓度的标准 ATP 溶液。
4. 在每孔中加入与 ATP 标准等体积的 BacTiter-GloTM 试剂 (1:1 比例)。
5. 在定轨振荡器上简短混合内容物, 孵育 1 分钟。由于不需要裂解释放 ATP, 所以不需要长时间孵育。
6. 记录荧光值。

IV. 附录

a) BacTiter-GloTM 检测概述

这个检测系统使用的是一个专利的热稳定萤光素酶 (Ultra-GloTM 重组萤光素酶), 使得 ATP 从细菌细胞中提取出来, 并发出稳定的“辉光型”萤光信号。过去, 从北美萤火虫 (*Photinus pyralis*) 纯化而来的萤火虫萤光素酶已经用于检测 ATP 的试剂中。然而这种酶在体外只有中等程度稳定性, 而且不耐 PH 值、去污剂这些因子, 使其在粗放均质的 ATP 检测中的应用受到限制。Promega 成功地开发出基于另一种萤火虫 *Photinus pennsylvanica* 的一种稳定形式的萤光素酶 (Ultra-GloTM 重组萤光素酶), 使用一种能选择在 ATP 检测性能方面有所提高的性质。另外, 我们开发了一个专利配方, 可以从不同的微生物细胞中快速有效地提取 ATP (表 1)。BacTiter-GloTM 试剂中这两个基本因素的结合使我们能够设计出在培养细胞中用均质一步法检测 ATP 的方案。这个试剂性质稳定, 提供的萤光输出灵敏而稳定。

表 1. BacTiter-GloTM 试剂作用于不同的微生物有机体

革兰氏阴性	革兰氏阳性	其它
<i>Escherichia coli</i> 大肠杆菌	<i>Staphylococcus aureus</i> 金黄色葡萄球菌	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 酿酒酵母
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 铜绿假单胞菌	<i>Enterococcus faecalis</i> 粪链球菌	<i>Candida albicans</i> 白色念珠菌
<i>Enterobacter cloacae</i> 阴沟肠杆菌	<i>Streptococcus pneumoniae</i> 肺炎链球菌	
<i>Flavobacterium okeanokoites</i> 海床黄杆菌	<i>Bacillus subtilis</i> 枯草芽孢杆菌	
<i>Haemophilus influenzae</i> 流感嗜血菌	<i>Bacillus cereus</i> 蜡状芽孢杆菌	
<i>Proteus vulgaris</i> 普通变形菌	<i>Arthrobacter luteus</i> 藤黄节杆菌	
<i>Salmonella typhimurium</i> 鼠伤寒沙门氏菌		
<i>Yersinia enterocolitica</i> 小肠结肠炎耶尔森氏菌		
<i>Francisella philomiragia</i> 蜃楼耶尔森氏菌		

b) 更多考虑因素

温度 :来自 BacTiter-Glo™ 检测的荧光信号的强度和衰减速率取决于荧光素酶反应的速率。影响荧光素酶反应速率的环境因子将引起光输出强度和荧光信号的稳定性的改变。温度是影响这个酶检测速率的因素之一,因而也影响光输出。要得到稳定的结果,在进行检测之前将检测平板在室温平衡。如果平衡不充分会在平板中心的孔和平板四周的孔之间引起温度梯度。

生长培养基 :生长培养基是影响背景荧光的另一因素。它影响荧光素酶反应的信号水平和信号稳定性(图4)。我们用的是 MH II 肉汤(调整过阳离子的 Mueller Hinton 肉汤; Becton, Dickinson Company, 目录号#297963)。在我们所有的实验中,都用这种培养基,除非指明是其它培养基,这种培养基适合绝大多数常见的好氧菌和兼性厌氧菌生长,并被食品与药物管理局(FDA)选来用于食品检测,并被美国临床实验室标准委员会(NCCLS)选择作为抗微生物灵敏性检测。MH 培养基的背景荧光较低,批与批之间的重复性好。

化合物 :荧光素酶反应的化学物质环境也将通过影响酶反应速度来影响荧光强度。测试的各种抗微生物活性的化合物的溶剂可能干扰荧光素酶反应并进而影响检测的光输出。可以通过检测含有培养基而不含细胞的平行对照孔来确定其对荧光素酶反应的干扰。经常被用于溶解的有机溶剂二甲基亚砷(DMSO)经测试在最终浓度为 2% 检测时对荧光输出仅有微小影响(<5%活性丧失)。

平板和试管推荐 :BacTiter-Glo™ 检测适合于多孔板和单管检测。我们推荐使用常规的适合荧光测量的不透明壁多孔板。有透明底部的不透明壁多孔板可以在显微镜下观察细胞,也可以使用。然而,这些平板的信号强度降低,孔之间的相互交谈增加。可用不透明白色胶带遮住底部来减少荧光量的损失,减少相互交谈。对于单管检测,与荧光发光计(如 Turner Biosystems 的 TD-20/20 荧光发光计)同买的常规试管就可以。

细胞中的 ATP 含量 :不同细菌每个细胞中的 ATP 含量不同。报道的细胞内 ATP 水平相差很大。影响细胞内 ATP 含量的因子,如生长阶段,培养基,以及代谢抑制物的存在,都会影响细胞数和荧光的关系。

混合 :只有将 BacTiter-Glo™ 试剂与培养的细胞样品完全混合,才能得到最佳检测性能。对于我们测试过的所有细菌,观察到的最大荧光信号是当有效混合并孵育 1-5 分钟之后。不过,从某些细胞、酵母或真菌中完全提取 ATP 可能需要更长的时间。使用移液力较强或较弱的自动移液枪可能影响后面所需要的混合程度。确保用定轨平板振荡装置将 96 孔板上的试剂完全混合,许多荧光发光计上配有这种振荡装置。我们建议在进行检测时考虑这些因素,并决定是否需要混合步骤和/或需要较长孵育时间。

试剂背景 :尽管有严格的无 ATP 生产过程,但在 BacTiter-Glo™ 缓冲液和底物中还是有痕量的 ATP 存在。另外,使用者可能在溶解步骤中引入 ATP,存在背景荧光,并随时间推移、ATP 的消耗而减少。这个过程被称作“烧光”。可能需要 2 小时才能达到最低的完全烧光背景。不过,仅在需要最大灵敏度时(如检测很低数量的微生物有机体时)才有必要这样做。

c) BacTiter-Glo™ 检测应用举例

BacTiter-Glo™ 检测是简单、皮实、灵敏度优越、动态范围好的定量微生物的方法。以下是几个应用的例子。

筛选抗微生物化合物

我们用 BacTiter-Glo™ 检测对一架来自 Sigma (LOPAC, #8, 酶抑制物, 共 80 个化合物) 的药物活性化合物进行了对金黄色葡萄球菌的抗微生物活性筛选。结果显示在图 5。所有的标准抗生素的阳性对照 (加框的点) 和 3 个 LOPAC 化合物 (画圈点) 都显示明显的抗金黄色葡萄球菌活性。3 个 LOPAC 化合物击中的是 D6, 大黄素; D11, 氧化血根碱; 和 H7, 甲胺四环素。它们的抗金黄色葡萄球菌活性已有文献报道。

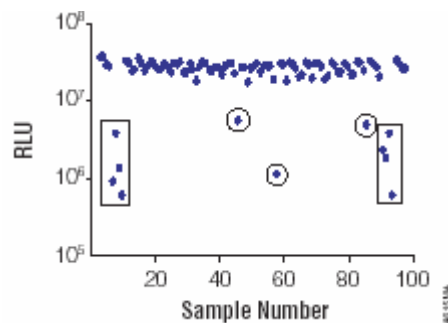


图 5. 应用 BacTiter-Glo™ 检测筛选抗微生物化合物。金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 菌株培养在 Mueller Hinton (MH II) 肉汤 (BD 目录号#297693, 见第 IV 部分生长培养基推荐) 于 37 °C 过夜。过夜培养物在新鲜的 MH II 肉汤中做 100 倍稀释, 作为抗微生物筛选的接种物。LOPAC 化合物的工作储存液 (50X) 和标准抗生素在二甲基亚砷中制备。96 孔板的每孔中含有 245ul 接种物和 5ul 的 50X 工作储存液。多孔板在 37°C 培养 5 小时。从每孔中取出 100ul 培养物, BacTiter-Glo™ 检测按照第 III 部分描述进行。萤光由 Turner Biosystems 公司的 Veritas™ 微孔板萤光发光计 (目录号#E6501) 测量。样品和浓度是: 第 1-4 孔和第 93-96 孔 2% 二甲基亚砷的阴性对照, 第 5-8 孔和第 89-92 孔 32ug/ml 的标准抗生素四环素, 氨卞青霉素, 庆大霉素, 氯霉素, oxacillin, 卡那霉素, piperacillin 和红霉素; 第 9-88 孔, 10uM 的 LOPAC 化合物。

评估抗微生物化合物活性

我们用 BacTiter-Glo™ 检测检查了 oxacillin 对金黄色葡萄球菌的剂量效果。结果显示在图 6 中。Oxacillin 的抗微生物活性显示剂量依赖性。在调整了阳离子的 MH II (MIC) 中, 已报道及观察到的对金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 的 Oxacillin 的最小抑制浓度是 0.125-0.5ug/ml, 大约相当于用 BacTiter-Glo™ 检测确定的计量曲线上的 IC75-IC90 值。

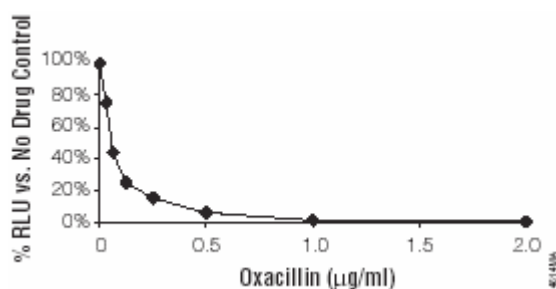


图 6. 使用 BacTiter-Glo™检测评估抗微生物化合物。金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 菌株和 oxacillin 的制备同图 5，在 37°C 孵育；根据 NCCLS 推荐的最小抑制物浓度确定方法在孵育 19 小时后进行。显示了相对于无 oxacillin 对照的相对 RLU 百分比。荧光由 Turner Biosystems 公司的 Veritas™微孔板荧光发光计（目录号 E6501）记录。

以更高的灵敏度和更长的范围检查细菌的生长

我们用 BacTiter-Glo™检测或光密度（O.D）测量检查了大肠杆菌的生长。结果显示在图 7。BacTiter-Glo™检测的更高的灵敏度和延长的范围使得使用者可以在接种后立即监测大肠杆菌的生长。若用 O.D 测量生长，接种后 5 小时才有第一次明显读数（0.025）。由 BacTiter-Glo™检测确定的生长曲线的动态范围超过 6 个数量级，而由 O.D 确定的生长曲线只有约两个数量级。这个增加的动态范围使得使用者可以更容易地监测生长缓慢的微生物。

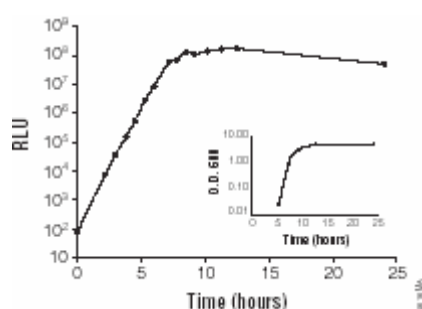


图 7. 使用 BacTiter-Glo™检测评估细菌生长。大肠杆菌 ATCC 25922 生长在 Mueller Hinton II (MH II) 肉汤 (B.D. 目录号 297963；见第 IV 部分的生长培养基推荐) 37°C 过夜。过夜培养物在新鲜的 50ml MH II 肉汤中按 1 : 10⁶ 稀释，250rpm 振荡 37°C 培养。在不同时间点取样，按本操作手册第 III 部分描述进行 BacTiter-Glo™检测。荧光由 Veritas™微孔板荧光发光计记录。光密度用 Beckman DU650 分光光度计在 600nm (O.D600) 测量。当 RLU 和 O.D 的读数分别超过 10⁸ 和 1 时，需要将样品稀释。

BacTiter-Glo™微生物细胞活性检测：熟练者操作手册

这个快速流程是给熟练者的易于操作的提醒，如果您是第一次使用 BacTiter-Glo™微生物细胞活性检测，请按照完整的操作手册（第 III.A 到 III.B 部分）进行。

试剂制备（第 III.A 部分）	<ol style="list-style-type: none"> 1. 使用前，融解 BacTiter-Glo™缓冲液，在室温平衡。为方便起见，BacTiter-Glo™缓冲液可在使用前 48 小时融解并贮存于室温。 2. 使用前将冻干粉 BacTiter-Glo™底物在室温平衡。 3. 将适当体积（目录号 G8230 和目录号 G8231 取 10ml；目录号 G8232 和目录号 G8233 取 100ml）的 BacTiter-Glo™缓冲液转移到含有 BacTiter-Glo™底物的安瓿瓶中来溶解冻干粉的酶/底物混合物。这就制成 BacTiter-Glo™试剂。 4. 温和振荡、涡动或上下颠倒混合，得到均质的溶液。BacTiter-Glo™底物应在 1 分钟内很容易地完全溶解。 5. 在室温平衡试剂至少 15 分钟。
从细菌中测量 ATP（第 III.B 部分）	<p>注意：所有步骤在室温进行。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 在不透明壁的多孔板内培养好带培养基的微生物细胞（例如，在 96 孔板上是 100ul，在 384 孔板上是 25ul）。 2. 准备只有培养基，不含细胞的对照孔，以获得背景萤光值。 3. 在室温平衡平板及内容物。 4. 向每孔中加入等体积的 BacTiter-Glo™试剂（例如，向 96 孔板的孔中的 100ul 培养基和细胞中加入 100ul 试剂）。 5. 在定轨震荡器上简短混合并孵育 5 分钟。 6. 记录萤光。 <p>注意：按照厂家指示设定仪器。一般可设每孔 0.25-1 秒的整和时间。</p>