

基于生物发光的高灵敏度 ATP 自动测试系统研究^①

岳伟伟^② 何保山 周爱玉 罗金平 蔡新霞^③

(中国科学院电子学研究所传感技术国家联合重点实验室 北京 100080)

(中国科学院研究生院 北京 100080)

摘 要 针对高灵敏度、宽响应范围及自动检测三磷酸腺苷(ATP)的需求,设计了一种基于生物发光原理的 ATP 检测系统。系统采用自动加样技术,在发光反应的同时开始记录光强,使仪表检测自动化,且提高检测灵敏度;在优化光电检测单元设计和减小杂散光及电磁干扰的同时,提高荧光检测效率;通过电路和数据处理算法优化提高仪表检测范围。以浓度为 $10^{-15} \sim 10^{-6}$ M 范围内的标准 ATP 溶液进行了实验,结果表明仪表测量光强与 ATP 实际浓度相关系数为 0.974,检测范围达 9 个数量级。与市场相关仪器相比,该系统具有自动化测试,性能和灵敏度高、响应范围宽的特点,在 ATP 测量以及相关领域如细菌测量、毒性测试及卫生状况检测等方面具有广泛的应用前景。

关键词 三磷酸腺苷(ATP), 生物发光, 检测系统, 自动加样

0 引 言

三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)是存在于所有生物细胞中的一种能量物质,是所有生命活动共同的能量载体^[1]。具有代谢活性的细胞含有一定量的 ATP,检测的 ATP 含量可作为培养细胞增殖和细胞毒性的定量指标^[2-5]。在细胞发生凋亡或坏死时,其 ATP 含量会迅速下降。通过检测 ATP 含量的改变,可以评价多种药物、生物制剂或生物活性物质引起的细胞杀伤、细胞抑制和细胞增殖作用^[6]。ATP 也常用作细胞定量检测的标志物,如细菌总数检测,活菌疫苗质量控制以及血液红细胞定量检测等^[7,8]。基于生物发光的 ATP 检测技术具有灵敏度高,检测速度快的特点,常常被用于 ATP 检测。研究证明,一个 ATP 分子反应释放一个光子,则体系所释放的光强就与体系中 ATP 的含量成一定关系^[9]。因此,体系中 ATP 的含量可以通过测量生物发光强度进行测量。这种技术目前已被广泛应用于细胞定性及定量检测领域^[10]。随着对基于生物发光的 ATP 检测需求的增加,市场上出现了针对 ATP 测量的商业化产品,包括英国 Hygiena 公司的 Pi-102 荧光检测系统^[11],美国 NHD 公司的 Profile-1 荧光检测系统以及德国 Merck 公司的 HY-LITE 荧光检测仪

等^[12,13]。然而,大部分商品化的仪表在设计及检测方面都还存在一些不足,包括手动加样,操作步骤繁琐,且会引入人为误差;同时,由于无法测量反应最初释放的荧光,降低仪表检测灵敏度;另外由于不能兼顾高浓度样品和低浓度样品,使仪表响应范围窄等。

针对以上问题,本文提出了一种基于生物发光的 ATP 自动检测系统,并在以下几个方面进行优化设计:(1)采用自动加样技术。在发光的同时检测光强,提高仪表灵敏度,并实现检测自动化。(2)优化光电检测单元设计。从器件选择、电磁干扰、杂散光干扰及荧光损耗等方面进行设计,提高检测效率。(3)从硬件电路和数据处理两方面进行设计,提高仪表的响应范围。本文对系统的自动加样精度、重复性、数据处理方法及电路设计进行了阐述,并利用设计的 ATP 生物发光自动检测系统对浓度为 $10^{-15} \sim 10^{-6}$ M 的 ATP 样品进行了实验研究。

1 系统设计

本文设计的 ATP 测量系统的结构如图 1 所示。系统包括三部分:自动加样单元,光电转换单元和信号处理及控制单元。自动加样单元用于将检测试剂

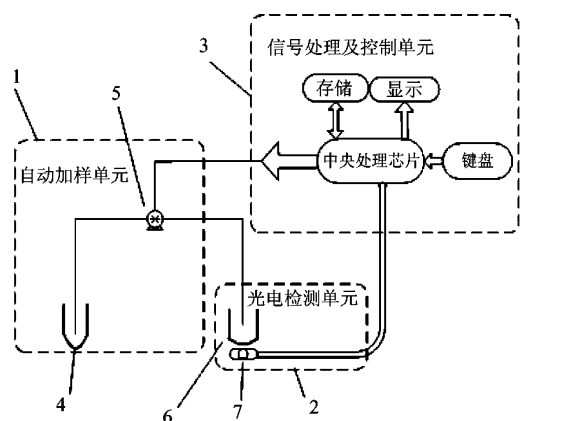
① 863 计划(2007AA04Z326),国家自然科学基金(60576049)和北京市科委(Z0006302040191)资助项目。

② 男,1980 年生,博士;研究方向:光学生物传感器及信号处理;E-mail: iecasyue@163.com

③ 通讯作者, E-mail: xxcai@mail.ie.ac.cn

(收稿日期:2008-03-06)

自动加入光生物传感池。光电转换单元用于将生物发光信号转换为电信号。信号处理及控制单元包括中央处理芯片,存储模块,显示模块以及其他外部接口模块,用于信号采集处理,并对测量结果进行存储和显示。



1. 自动加样单元;2. 光电检测单元;3. 信号处理及控制单元;
4. 试剂瓶;5. 蠕动泵;6. 光生物传感池;7. 光电倍增管

图 1 ATP 生物发光检测系统结构示意图

1.1 自动加样单元

自动加样单元包括试剂瓶和加样泵。加样泵选用 WX10 型蠕动泵(兰格精密泵有限公司,河北),尺寸为 57mm(长)×57mm(宽)×64mm(高),最小流量为 6 μ L,由系统软件控制自动向光生物传感池注入检测试剂。本文对自动加样单元的精度及重复性进行了测试。

1.2 光电检测单元

光电转换单元用于将光生物传感池产生的生物发光转换为可处理的电信号。光生物传感池实物如图 2 所示,由对生物发光有高透过率的聚碳酸酯材料制作,采用注塑工艺制备而成,尺寸为 13mm(高)×8mm(直径),最大容量为 600 μ L。

生物发光强度极其微弱,光电检测单元也因此成为本系统的核心部分,其设计结构图如图 3 所示。为减小杂散光干扰、电磁干扰以及荧光损耗,光电检测单元主要从一下几个方面进行设计:

(1) 选择高灵敏度的光电倍增管(photo multiplier tube, PMT)作为光电转换器件。PMT 的响应波长与 ATP 生物发光波长一致,为 550nm。本文选用 H5773-02 型光电倍增管(滨松,日本)作为光电转换器件,在 500 ~ 600 nm 之间具有稳定响应。同时, H5773-02 型 PMT 具有尺寸小(50mm(长)×25mm(宽)×18mm(高))的特点,适合集成化,便携式荧光

检测仪的设计研究。

(2) 由于 PMT 易受电磁干扰,因此光电检测单元完全由金属加工而成,并将 PMT 固定其中。

(3) 为减小杂散光对系统检测的影响,光电检测单元整体经过氧化发黑处理;为减小对生物荧光的吸收损耗,样品架不进行发黑处理,而进行抛光处理,使其具有更高的反射率。光电检测单元的实物图如图 4 所示。

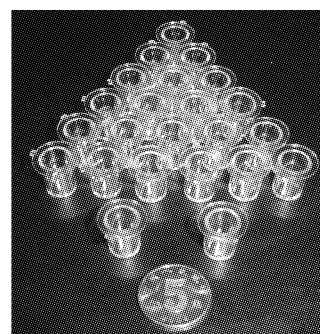


图 2 光生物传感池实物

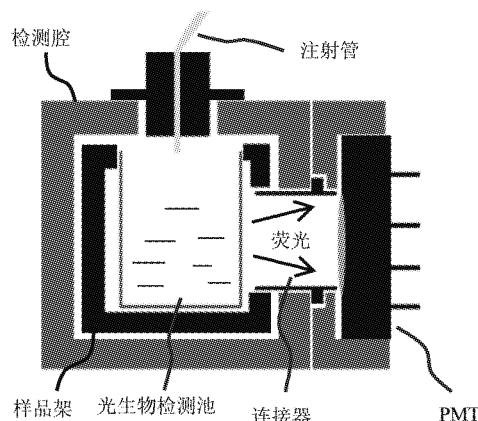


图 3 光电检测腔结构示意图

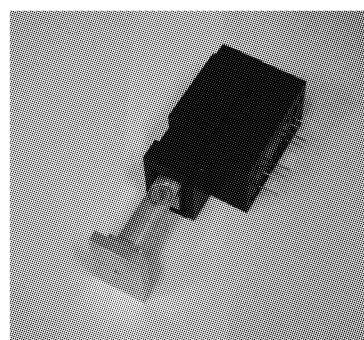


图 4 光电检测单元实物

1.3 信号处理及控制单元

信号处理及控制单元用于控制自动加样单元的

加样,信号采集放大及数据处理以及结果显示与存储。为提高 ATP 检测系统的响应范围,系统从硬件电路和数据处理两方面进行设计:

(1) 硬件电路方面采用两级放大电路设计,并对两级电路的输出信号进行存储,用于数据处理。电路图如图 5 所示。

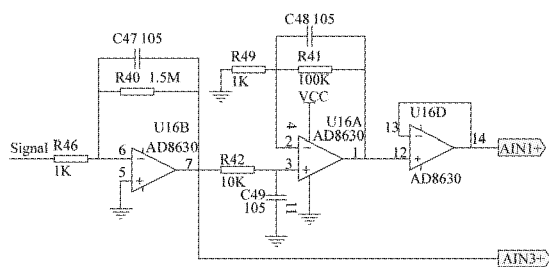


图 5 两级信号放大电路

由于 H5773-02PMT 的暗电流为 2nA,同时所选的中央处理芯片最大输入电压 2.5V,因此放大电路的放大倍数为 10^8V/A ,其中第一级为 10^6V/A ,用于测量高浓度样品,第二级为 10^8V/A ,用于测量低浓度样品。

(2) 对于更高浓度的样品,第一级放大电路超出测量量程,则采用基于 ATP 生物发光动力学的数据拟合处理。实验证明,ATP 生物发光随时间按指数规律衰减,如图 6 所示。对于超量程部分的数据,则通过指数拟合获得反应初期的数据,从而提高仪表的响应范围。

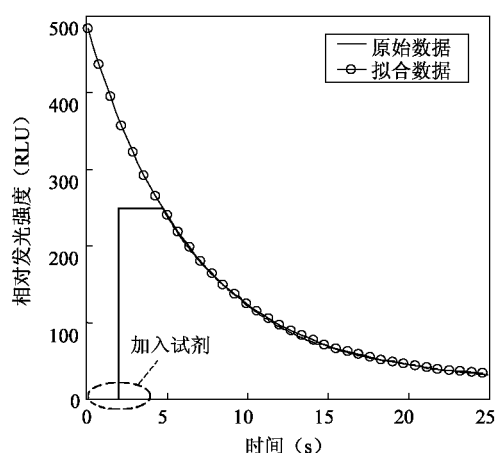


图 6 生物发光反应动力学曲线及指数拟合曲线

2 实验

2.1 仪器材料

荧光素和荧光素酶 (EC 1.13.12.7, 14.9mg/mL)

购自普洛麦格公司(美国)。三磷酸腺苷钠盐(ATP)购自上海生物科技有限公司,并利用 Tris 缓冲溶液调节其 pH 值到 7.8。其他所有试剂皆为分析纯。实验环境温度为室温 25℃。

F4500 型荧光分光光度计,购自日本日立。

2.2 实验方法

2.2.1 自动加样单元测试方法

对自动加样单元从加样精度和重复性进行实验。首先,自动加样单元被设定为 1~8s 不同的加样时间,对于每个设定的加样时间,重复向同一光生物传感池中注入检测试剂,重复次数为 10 次,记录每一次加样后光生物传感池中试剂的总体积,获得试剂总体积与加样次数之间的线性相关性,根据线性相关系数的高低测试不同加样时间条件下自动加样单元的加样精度。然后,使用不同的光生物传感池,在同一加样时间下重复加样 14 次,获得自动加样单元的加样精密度,测试自动加样单元的加样重复性。

2.2.2 光电检测单元测试方法

光电检测单元是本检测系统的核心部分,其稳定性是决定系统测量结果可靠性的关键。以固定的发光二极管作为测试光源,其波长与 ATP 生物发光波长相一致,约为 550nm。发光二极管由恒流源驱动,所发射的光强在短时间内是固定值。在 4 个不同时刻,分别测量光电检测单元的输出信号,每次重复测量 8 次,根据测量的精密度测试光电检测单元的稳定性。

2.2.3 标准 ATP 检测实验方法

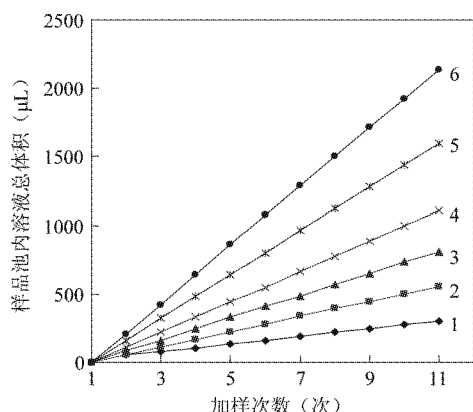
制备标准的 ATP 样品,浓度范围为 $10^{-15} \sim 10^{-6}$ M。首先,向光生物传感池中加入 75μL ATP 待测溶液,然后将光生物传感池推入光电检测腔中。在信号处理及控制单元控制下,自动加样单元向光生物传感池中注入 215μL 发光试剂。在加入试剂的同时,光电检测单元开始采集生物发光信号,并将测量结果实时上传至计算机显示并保存。测量时间为 400s。测量完毕后,对记录数据进行数据处理,获得测量结果与 ATP 真实浓度间的相关性。

3 实验及讨论

3.1 自动加样单元精度及重复性实验结果

自动加样单元的精度测试结果如图 7 所示。曲线 1~6 分别代表在加样时间 1s, 2s, 3s, 4s, 6s 以及 8s 条件下,自动加样单元向光生物传感池中注入的样品总体积与加样次数间的相关性曲线,对应的

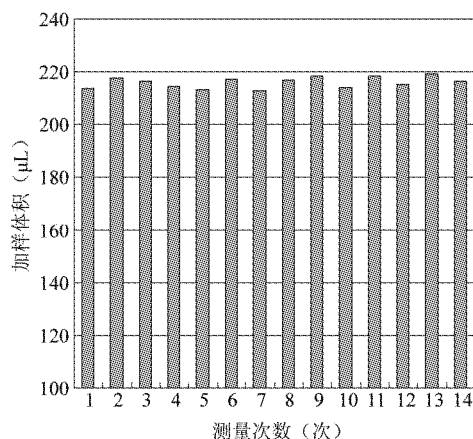
线性相关系数分别为 0.9994, 0.9998, 0.9998, 0.9999, 1, 1。由结果可以看出, 在同一加样时间条件下, 注入的样品体积与加样次数间有很好的线性相关性, 说明自动加样单元的加样精度可以满足系统检测的需求。



(曲线 1 到 6 分别代表加样时间为 1s, 2s, 3s, 4s, 6s 及 8s 情况下, 加样累积总体积与加样次数的相关性曲线)

图 7 自动加样单元不同加样时间条件下的加样精度

由于在 ATP 测量实验中, 需要向光生物传感池中注入的检测试剂体积为 $215\mu\text{L}$, 与加样时间为 8s 时注入的试剂体积吻合。因此在加样时间为 8s 的条件下, 对自动加样单元的重复性进行了实验, 重复次数为 14 次, 实验结果如图 8 所示。在上述实验条件下, 自动加样单元的平均加样体积为 $215.74\mu\text{L}$, 标准偏差为 $1.9\mu\text{L}$, 精密度为 0.9%, 具有很好的加样重复性。



(加样时间为 8 秒, 重复次数为 14 次)

图 8 自动加样单元重复性测试

3.2 光电检测单元稳定性实验结果

对光电转换单元的稳定性测量结果见表 1。由表 1 可以看出, 在 4 个不同时刻对光电检测单元进行测试, 每次重复测试 8 次, 共测试 32 次。测量标

准偏差为 1.21mV , 变异系数为 0.758%, 说明光电检测单元具有很好的测量重复性。

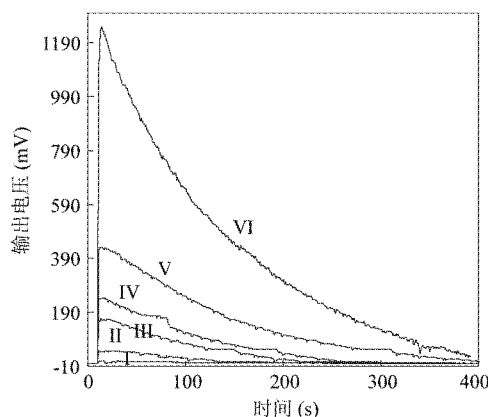
表 1 光电检测单元稳定性实验结果

测量次数	不同时刻测量结果(mV)			
	1	2	3	4
1	159.6	162.9	162.1	160.0
2	160.5	159.8	160.7	161.2
3	159.9	159.3	159.1	162.0
4	161.3	159.0	158.6	161.1
5	162.7	159.5	159.0	161.0
6	160.3	161.3	160.0	161.1
7	161.2	160.3	160.2	162.8
8	160.3	161.2	162.84	162.2
标准偏差(mV)	1.21			
变异系数(CV)	0.758%			

3.3 ATP 样品检测实验结果

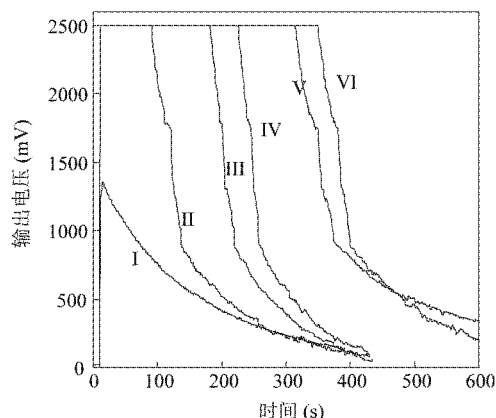
ATP 样品的浓度分别为 10^{-15} , 10^{-14} , 10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} 以及 10^{-6} M, 覆盖 9 个数量级。图 9 为第一级放大电路的测量结果, 图 10 为第二级放大电路的测量结果。

由图 9 和图 10 可以看出, 对于 ATP 浓度为 $10^{-14} \sim 10^{-6}$ mol/L 的样品, 第二级放大电路的输出信号超出量程, 即图 10 中曲线 II - VI 的水平部分, 须采用第一级放大电路的输出信号; 而对于浓度为 10^{-15} mol/L 的 ATP 样品, 其第一级放大电路输出信号微弱, 即图 9 中的曲线 I, 存在较大误差, 须采用第二级放大电路的输出信号。利用 1.3 中所介绍的数据处理方法, 对以上数据进行数据处理。图 11 为经过上述数据处理后, 仪表测量的最终结果。



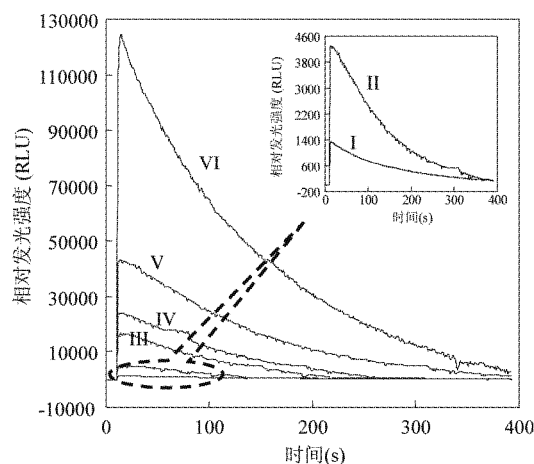
(ATP 浓度: I. 10^{-15} mol/L, II. 10^{-14} mol/L, III. 10^{-12} mol/L, IV. 10^{-10} mol/L, V. 10^{-8} mol/L, VI. 10^{-6} mol/L, 检测时间为 400s)

图 9 第一级放大电路获得不同 ATP 浓度样品的反应动力学曲线



(ATP 浓度: I. 10^{-15} mol/L, II. 10^{-14} mol/L, III. 10^{-12} mol/L, IV. 10^{-10} mol/L, V. 10^{-8} mol/L, VI. 10^{-6} mol/L, 检测时间为 400s)

图 10 第二级放大电路获得不同 ATP 浓度样品的反应动力学曲线



(ATP 浓度: I. 10^{-15} mol/L, II. 10^{-14} mol/L, III. 10^{-12} mol/L, IV. 10^{-10} mol/L, V. 10^{-8} mol/L, VI. 10^{-6} mol/L)

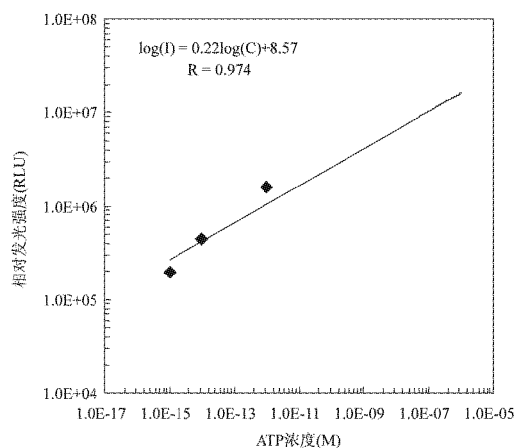
图 11 数据处理后不同浓度 ATP 样品的反应动力学曲线

根据图 11 中的结果,对每一条测试曲线,对其在整个测试时间 400s 内的测试数据进行积分作为每一个 ATP 样品所释放的总发光强度。图 12 为 ATP 样品发光强度与对应 ATP 浓度间的相关曲线。

由图 12 可以看出,在 ATP 浓度为 10^{-15} M 到 10^{-6} M 的检测范围内,两者的线性相关系数为 0.974,获得标准方程如方程

$$\text{Log}(I) = 0.22 \times \text{Log}(C) + 8.57$$

所示。其中, I 是 ATP 生物发光强度, C 是检测样品中 ATP 的浓度。实验结果表明, ATP 样品浓度在 $10^{-15} \sim 10^{-6}$ M 范围内, 仪表测量结果与 ATP 实际浓度具有较好的相关性。



(ATP 浓度分别为 10^{-15} mol/L, 10^{-14} mol/L, 10^{-12} mol/L, 10^{-10} mol/L, 10^{-8} mol/L, 10^{-6} mol/L)

图 12 ATP 浓度与相对发光强度间的相关性关系

4 结论

本文设计了一种 ATP 生物发光自动检测系统。系统利用自动加样单元向光生物传感池中注入检测试剂,提高检测灵敏度且使仪表实现自动测量;优化光电检测单元设计,在减小杂散光干扰、电磁干扰的同时,提高荧光检测效率;信号处理及控制单元采用两级放大电路设计并结合数据拟合处理,提高仪表的响应范围。对自动加样单元、光电检测单元进行了测试,实验结果表明可以满足 ATP 检测的需求。以浓度为 $10^{-6} \sim 10^{-15}$ M 的 ATP 样品为实验对象进行测试。结果表明,系统的测量结果与 ATP 样品实际浓度间的线性相关系数为 0.974,且仪表具有较宽的测试范围,可覆盖 9 个数量级,优于市场已有产品。因此,本文设计的 ATP 检测系统具有测量自动化,精度高,响应范围宽的特点,在 ATP 测量领域以及相关领域如细菌总数检测,活菌疫苗质量控制方面有广泛应用前景。

致谢:感谢国家 863 项目(项目编号 No. 2007AA04Z326)、北京市科学技术委员会(项目编号:Z0006302040191)以及国家自然科学基金(项目编号 No. 60576049)对本项目的资助。

参考文献

- [1] Tobias K, Christian B, Oberd A, et al. Fast and reliable determination of intracellular ATP from cells cultured in 96-well microplates. *J Biochem Biophys Methods*, 2003, 57: 247-251
- [2] Swamy K M K, Kwon S K, Lee H N, et al. Fluorescent sensing of pyrophosphate and ATP in 100% aqueous solution using a fluorescein derivative and Mn^{2+} . *Tetrahedron Lett*

- ters, 2007, 48: 8683-8686
- [3] Loo W T Y, Tong J M K, Cheung M N B, et al. A new predictive and prognostic marker (ATP bioluminescence and positron emission tomography) in vivo and in vitro for delivering adjuvant treatment plan to invasive breast tumor patients. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2006, 60: 285-288
- [4] Makiko N, Masayasu M, Hisakage F, et al. Cell-surface-localized ATP detection with immobilized firefly luciferase. *Analytical Biochemistry*, 2006, 352: 61-67
- [5] Sandrine A, Marie-Line D, Pierre S. Use of ATP measurements by bioluminescence to quantify yeast's sensitivity against a killer toxin. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 495: 217-224
- [6] Julie A, Long H, David G. Validation of a rapid, large-scale assay to quantify ATP concentration in spermatozoa. *Theriogenology*, 2006, 65: 1620-1630
- [7] Silvana V, Frederik H, Markus B, et al. Rapid and direct estimation of active biomass on granular activated carbon through adenosine tri-phosphate (ATP) determination. *Water Research*, 2007, 41: 1973-1983
- [8] Eydal H S C, Pedersen K. Use of an ATP assay to determine viable microbial biomass in Fennoscandian Shield groundwater from depths of 31000 m. *Journal of Micro-biological Methods*, 2007, 70: 363-373
- [9] Jane-Marie H, John H. ATP: a universal hygiene monitor. *Trends in Food Science & Technology*, 1997, 8: 79-84
- [10] Tatsuya S, Seiji M, Kazuhiro I. Enumeration of bacterial cell numbers by amplified firefly bioluminescence without cultivation. *Analytical Biochemistry*, 2003, 312: 48-56
- [11] Hygiena, Inc. Pi-102™, Multifunctional Luminometer. http://hygiena.net/all_products.html, 2009
- [12] 北京浩正智信科技发展有限公司. Profile-1 3560 10X 食品细菌快速测定仪. <http://www.instrument.com.cn/netshow/SH100878/C15602.htm>, 2009
- [13] Merck. HY-Lite 2 (product number: 130100). <http://www.merck-chemicals.com/food-analytics>, 2009

Study of an automatic ATP detecting system with high sensitivity based on bioluminescence

Yue Weiwei, He Baoshan, Zhou Aiyu, Luo Jinping, Cai Xinxia
(State Key Laboratory of Transducer Technology, Institute of Electronics,
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)
(Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract

To meet the needs of automatic adenosine triphosphate (ATP) detection with high sensitivity and wide response range, an ATP detection system was designed based on bioluminescence. By recording the light intensity at the beginning of the bioluminescence reaction using the automatic injection technology, the system can detect samples automatically with high sensitivity. The photo-electronic detection unit was optimized to decrease the influence of stray light and electromagnetism and increase the efficiency of luminescence detection. The circuit and data processing algorithm was optimized to broaden the detection range. The ATP samples with the concentration of $10^{-15} \sim 10^{-6}$ M were measured and the correlation coefficient between the ATP concentration and the light intensity was 0.974. The detection range was over 9 magnitudes. Compared with the commercial products, the system in this paper has the virtues of automatization, high sensitivity and wide detection range. Therefore, the ATP system has a great potential in ATP measurement and the corresponding fields such as bacteria, toxicity and hygienic conditions, and so on.

Key words: adenosine triphosphate (ATP), bioluminescence, detection system, automatic injection