



Détermination du rayonnement concomitant entre puits dans des plaques de microtitrage utilisées pour des mesures de luminescence

Stephen Knight BSc MA, Porvair Sciences Ltd, Leatherhead, Angleterre - Web : www.porvair-sciences.com

L'utilisation d'essai de luminescence et de réactifs appropriés pour la découverte de médicaments a considérablement augmenté au cours des dix dernières années...



Figure 1

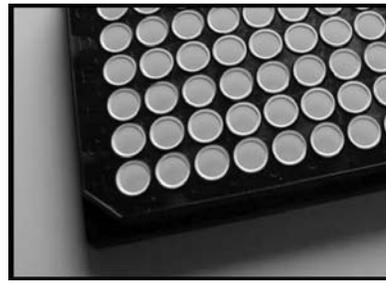


Figure 3

Lucioles (Lampyridae), le copépode marin Metridia Longa et la pensée de mer Renilla Reniformis contiennent tous des enzymes de la classe luciférase...

lire en modes absorbance, fluorescence ou luminescence.

Trois méthodes de détection optique sont présentées schématiquement dans la Figure 2.

Considérations relative à la conception des microplaques

Les microplaques pour utilisation dans le développement d'essais et la détection à haut débit sont normalement fabriquées à partir de polymère de polystyrène.

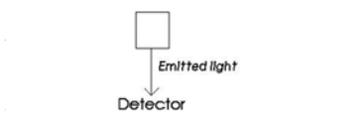
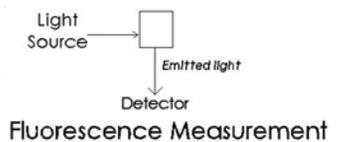
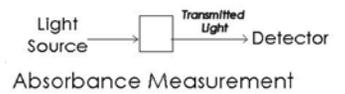


Figure 2

Des difficultés peuvent survenir lorsqu'on utilise des essais à la luciférase dans des procédures de détection dans lesquelles une fourchette dynamique élevée est observée sur toute la plaque.

Méthodes photométriques

L'étude compare deux microplaques à puits peu profonds en polystyrène blanc de fabricants différents avec le modèle breveté de Porvair Sciences qui combine des puits individuels et une matrice de plaque noire intense (Figure 1).

En transfectant des cellules avec une construction générique qui inclut un gène de luciférase, la luciférase peut servir de rapporteur pour évaluer l'activité de transcription à l'intérieur des cellules...

Pour les mesures de fluorescence, il est très important de « désactiver » l'auto-fluorescence du substrat en polystyrène.

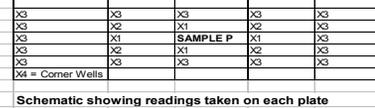
Lorsqu'une plus grande sensibilité est requise, les mesures de fluorescence sont préférables. Dans ce cas, un faisceau d'excitation d'une longueur d'onde donnée est dirigé sur le puits.

La bioluminescence est un phénomène se présentant naturellement chez certaines espèces animales et végétales, qui peuvent émettre de la lumière au moyen de l'un des deux mécanismes communément rencontrés, celui de la aequorine et celui de la luciférase.

Table with 5 columns: Average P, Average X1, Average X2, Average 3, Average 4. Data for Porvair plate - Black with white wells.

Table with 5 columns: Average P, Average X1, Average X2, Average 3, Average 4. Data for Solid White Plate 1.

Table with 5 columns: Average P, Average X1, Average X2, Average 3, Average 4. Data for Solid White Plate 2.





cheminée » Porvair (image de gauche). Chaque puits est doté de parois de puits formées individuellement et séparées de la matrice de plaque.

Pour surmonter ce problème de conduite de lumière par le plastique blanc, Porvair Sciences a développé et breveté une plaque unique noir et blanc à 96 puits (Figure 3, image de droite). Une matrice en polystyrène noir a des cellules blanches individuelles moulées à l'intérieur en cours de production, dans ce qu'il est convenu de désigner comme un processus en deux temps. Cet outillage en deux temps est également utilisé pour mouler des puits transparents individuels en une matrice blanche ou noire pour faire des plaques Porvair Sciences Krystal 2000™ sans rayonnement concomitant destinées aux applications de lecture de fonds par absorbance et fluorescence.

En incorporant des puits blancs brillants contenant jusqu'à 18 % de TiO2 dans leur formule dans une matrice noire à 1 % de carbone, le rayonnement optique concomitant est presque éliminé dans la nouvelle plaque. De fait, les données ci-dessous montrent que, par comparaison à deux plaques d'essai en blanc intense produites par d'autres fabricants, les plaques noires et blanches présentent respectivement une moyenne de 82 % et 56 % de moins de rayonnement concomitant entre puits.

Méthode de recherche

Les lectures ont été prises au moyen d'un spectrophotomètre multi-modes POLARStar Omega de BMG Labtech à 510 nm en utilisant une quantité de 5 µl d'une solution contenant de la luciférase et de la luciférase de luciole pipetée dans le puits C4 de chaque plaque à 96 puits (montré comme « P » dans les données ci-dessous). Une aliquote de 5 µL de peroxyde d'hydrogène a été ajoutée pour initier la réaction. Afin de permettre la dégradation du signal luminescent dans le temps, quatre lectures d'une durée de 1 seconde chacune ont été faites sur chacun des puits vides environnants et une moyenne a été calculée. Les valeurs sont montrées dans les données comme « Cycle 1, 2, 3 et 4 ». Chaque cycle représente 1 minute de temps écoulé depuis la prise de la première lecture. Cela est nécessaire du fait que les signaux de la luciférase se dégradent rapidement sur une période de 8 à 10 minutes et, par conséquent, les lectures sont prises jusqu'à ce que le signal soit tombé à presque 50 % du niveau initial.

Les lectures ont été prises à partir de quatre types différents de puits : X1 = puits partageant un puits avec le puits d'échantillon X2 = puits partageant un angle avec le puits d'échantillon X3 = puits à une distance exacte d'une cellule par rapport au puits d'échantillon X4 = puits se trouvant à l'angle du bloc, à deux cellules de distance de l'échantillon.

Seule une plaque a été préparée pour chaque expérience et tous les soins ont été pris pour ne sélectionner qu'une seule plaque propre inutilisée prise dans un paquet non encore ouvert. Cette procédure a été répétée pour les plaques des autres fabricants. Une plaque vide du même type a été utilisée pour prendre une lecture de base pour le calcul du rapport signal-bruit.

Résultats

Le rapport calculé signal-bruit pour la plaque noire & blanche à 96 puits Porvair

était de 192000:1, par comparaison à un rapport de 178000:1 pour une plaque blanc intense, ce qui représente une augmentation utile de 7,5 % du signal mesurable sur le fonds. Dans les puits les plus proches de la mixture de réaction (cellules X1), le rayonnement concomitant mesuré était juste de 0,026 % dans la plaque noire et blanche Porvair Sciences, par opposition à 0,041 % et 0,048 % dans les deux autres plaques blanc intense, une amélioration de 82 %.

Dans les expériences de rayonnement concomitant de luminescence, il n'est pas utile d'exécuter un « blanc » avec seulement un tampon ou de l'eau du fait qu'aucun signal observable ne sera perçu.

Si une telle expérience était exécutée, toute lecture du photo-détecteur serait due soit à de la lumière parasite pénétrant dans le compartiment de l'échantillon, soit au « courant d'obscurité » qui représente un bruit à quantum continu provenant des circuits électroniques et des éléments du détecteur et automatiquement corrigé par le micro-logiciel de l'instrument.

Conclusion

Les résultats montrent clairement que la plaque noire et blanche composite de Porvair Sciences a beaucoup à offrir pour la détermination des essais à base de luciférase à faible niveau dans la détection et le développement de médicament. La combinaison entre désactivation effective

au carbone noir et réflectivité accrue de l'azureur au dioxyde de titane donne un meilleur rapport signal-bruit et une meilleure fourchette dynamique intra-plaque, ce qui donne aux détecteurs la possibilité de détecter des résultats plus faibles, à des niveaux plus bas de détection ou avec des concentrations réduites de réactifs.

L'auteur est directeur des ventes et de marketing chez Porvair Sciences Ltd, Leatherhead, Surrey, Angleterre. Il a occupé des postes dans le secteur ventes et marketing dans un certain nombre de sociétés de spectroscopie et de réactifs, notamment Philips-Pye Unicam, Shimadzu, Jasco, Gilford Systems, Packard Bioscience et Perkin Elmer.

Advertisement for Accela™ High-Speed LC. The top part features a desert landscape with a road leading to the horizon under a blue sky, with the text 'Plus de limites' in large white letters. Below the image, the text reads 'Accela™ High-Speed LC: Des séparations HPLC et U-HPLC en un seul système efficace et sans limites'. On the left side of the image, there is a vertical copyright notice: '©2007 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries.'

Les analyses sont plus rapides, plus faciles et plus fiables.

La nouvelle chaîne chromatographique Accela vous permet des séparations sur une grande plage de débits et pressions, et ceci avec un seul instrument.

- Des pressions HPLC classiques jusqu'à 15 000 psi
- Volume mort de seulement 65µl pour un transfert rapide de gradients complexes de la pompe à la colonne
- Performances optimisées pour des colonnes de particules inférieures à 2µm, incluant l'Hypersil GOLD™



Sensibilité, reproductibilité et résolution inégalées pour l'analyse de vos échantillons

Visitez [www.thermo.com/accela](http://www.thermo.com/accela), et découvrez comment Accela, couplée à votre spectromètre de masse peut amener une productivité et un débit analytique sans limites dans votre laboratoire.

Tél 01 60 92 48 00 Courriel: [analyze.fr@thermo.com](mailto:analyze.fr@thermo.com)