

# Applications

Note 215 | September 2009

## Technical Report

# Untersuchung der Eignung weißer Eppendorf Polypropylen Microplates für den Promega CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Assay

Natascha Weiß<sup>1</sup>, Daniel Wehrhahn<sup>1</sup>, Sarah Shultz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland; <sup>2</sup>Promega Corporation, Madison WI, USA

### Zusammenfassung

Weiße Eppendorf Microplates eignen sich sehr gut für Lumineszenzassays, da die Signalintensität durch Reflektion maximiert wird. Zusätzlich wird durch das lichtundurchlässige Material „Crosstalk“ zwischen den Wells reduziert. In diesem Technical Report werden drei weiße Eppendorf Microplates (96/V, 96/U, 384/V) mit dem CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Assay (Promega) getestet. Durch Quantifizierung der seriellen Verdünnung eines ATP-Standards im Bereich von 10 nM bis 10 µM wird gezeigt, dass mit allen Plattentypen zuverlässige Daten generiert werden können, die die hohe Qualität des Assaysystems belegen. Die beste Sensitivität wurde mit den V-Boden Platten erzielt.

### Einleitung

Lumineszenz ATP-Assays werden üblicherweise zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen in Kultur eingesetzt. Wenn mehrere Proben gleichzeitig bearbeitet werden sollen, wird der Assay und die Analyse häufig im Multiwell-Plattenformat durchgeführt. Lichtundurchlässige Platten sind hierfür am besten geeignet, da sie verhindern, dass Signale von einem Well in das andere übertragen werden (Crosstalk). Weiße Platten bieten besonders Vorteile in Lumineszenzassays, da sie eine bessere Lichtreflektion und ein verstärktes Signal im Vergleich zu schwarzen Platten aufweisen. Schwarze Platten werden hingegen häufiger in Fluoreszenzassays eingesetzt und speziell die schwarzen Eppendorf Microplates zeigen eine hohe Sensitivität und Präzision in einem PicoGreen<sup>®</sup> Assay [1].

Eppendorf bietet drei Varianten weißer Microplates an: zwei 96-Well Platten mit entweder einem V-Boden oder einem U-Boden und eine 384-Well Platte mit einem V-Boden. Alle drei Platten bestehen aus Polypropylen, welches gegenüber Polystyrol eine hohe Temperatur- und Chemikalienbeständigkeit aufweist sowie eine deutlich geringere Bindung von Nukleinsäuren und Proteinen zeigt.

Die sorgfältige Auswahl des weißen Materials und die optimierte Wellform in Kombination mit der hochwertigen Verarbeitung ist auf eine hohe Reflektion ausgelegt, welche zu einer hohen Assaysensitivität beiträgt.

Der CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay ist eine homogene Methode zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen in Kultur. Er basiert auf der Quantifizierung des vorhandenen ATP, welches ein Indikator für metabolisch aktive Zellen ist. Der Assay ist für den Einsatz im Multiwell-Plattenformat ausgelegt, womit er ideal für automatisiertes High Throughput Screening (HTS) sowie Zellproliferations- und Zytotoxizitätsassays geeignet ist. Das erzeugte Lumineszenzsignal ist proportional zur Menge des vorhandenen ATPs [2]. Hier wurde der CellTiter-Glo Assay unter Verwendung aller drei Typen weißer Eppendorf Microplates von Promega durchgeführt, um einerseits die Kompatibilität mit diesem Assay-System zu ermitteln und andererseits die Platten in ihrem Ergebnis miteinander zu vergleichen. Dazu wurde eine ATP-Standardkurve aus einer Verdünnungsreihe erstellt und aus den erhaltenen Messwerten verschiedene statistische Parameter errechnet.



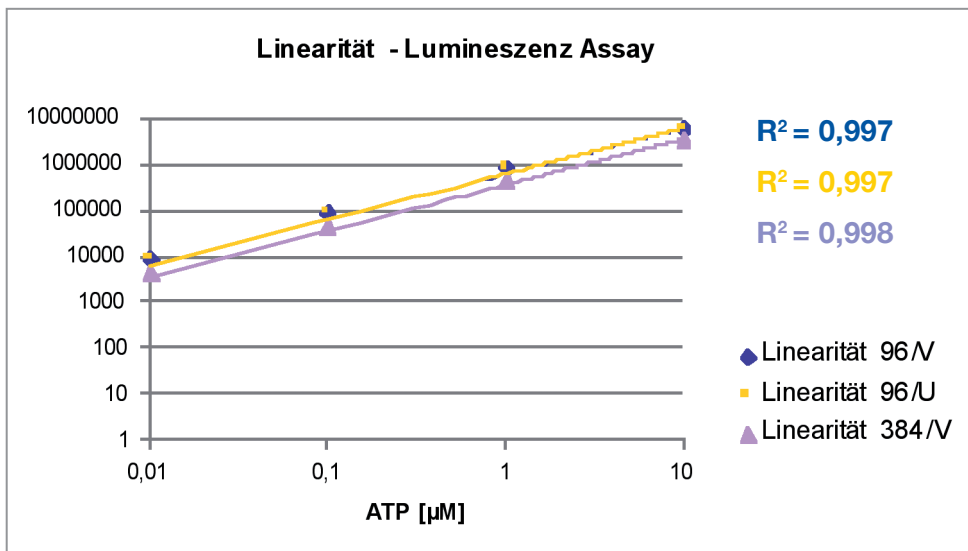
Das CellTiter Glo Reagenz wurde entsprechend der Anleitung des Kits hergestellt [2]. Zu dem Volumen des ATP-Standards in den Wells wurde jeweils das identische Volumen an Reagenz hinzugegeben. Die Platten wurden bei ~400 rpm für 2 Minuten bzw. ~1200 rpm für 384-Well Platten auf einem Plattenschüttler gemischt und danach zur Stabilisierung des Lumineszenzsignals für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte die Messung der Lumineszenz im Safire<sup>2</sup>™ (Tecan) bei 500 ms Integrationszeit. Die Daten wurden anschließend mit einem Tabellenkalkulationsprogramm analysiert und folgende statistische Parameter berechnet: Mittelwert und Standardabweichung der Lumineszenzsignale pro Experimentgruppe (RLU), Variationskoeffizient (%CV), Nachweisgrenze (LOD), Signal-Rausch-Verhältnis, Z'-Faktor.

Die Linearität wurde mittels linearer Regression aus dem Mittelwert der entsprechenden Replikate einer Eppendorf Microplate (korrigiert durch die Negativkontrolle) bestimmt. Die Nachweisgrenze basiert auf dem Mittelwert der Negativkontrolle plus der dreifachen Standardabweichung der Negativkontrolle [3]. Der Variationskoeffizient setzt die Streuung der Werte ins Verhältnis zum Mittelwert. Aus dem Verhältnis von Signal und der Standardabweichung der Negativkontrolle berechnet sich das Signal-Rausch-Verhältnis. Der Z'-Faktor beschreibt die Qualität eines Assays [4]. Diese Parameter wurden zur Bewertung und zum Vergleich der unterschiedlichen Plattentypen herangezogen.

### Ergebnisse und Diskussion

Die Linearität dieses Assays in Eppendorf Plates zeigt den Zusammenhang zwischen der Konzentration des ATP-Standards und dem gemessenen Signal. Das Bestimmtheitsmaß entspricht für jeden Plattentyp

$R^2 \geq 0,997$ , womit die Linearität über den gesamten Messbereich belegt ist (Abb. 2). Das bedeutet, dass ATP im Konzentrationsbereich von 10 nM bis 10  $\mu$ M sicher nachgewiesen werden kann.



**Abbildung 2:** Linearität der Ergebnisse für die Eppendorf Microplates 96/V, 96/U und 384/V im Bereich von 0,01 bis 10  $\mu$ M ATP in logarithmischer Darstellung.

Weitere Kriterien, die herangezogen werden, um die Eignung der Platten zu beurteilen, sind in Tabelle 1 aufgeführt. Diese Daten lassen erkennen, dass die Platten sehr gut für Lumineszenzassays einsetzbar sind.

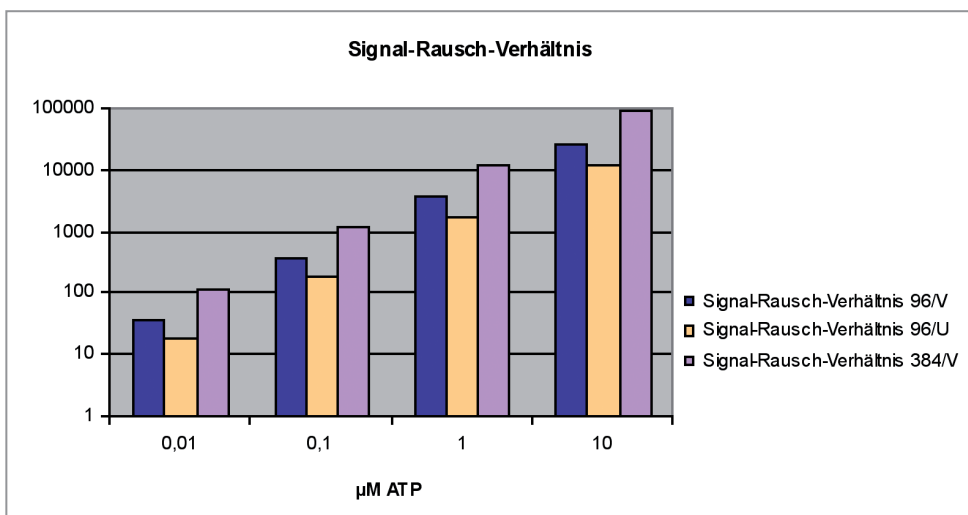
Die LOD ist ein Maß für die Sensitivität eines Assays. Die beste Sensitivität wurde mit einer Nachweisgrenze von 0,333 nM mit der Eppendorf Microplate 384/V festgestellt. Die weiteren Parameter: Variationskoeffizient, Signal-Rausch-Verhältnis und Z'-Faktor wurden für die niedrigste getestete ATP-Konzentration von 10 nM analysiert. Die Microplate 96/V weist hier mit einem Variationskoeffizienten

von 2 % die höchste Präzision auf. Das Signal-Rausch-Verhältnis ist ein Maß für die relative Sicherheit, mit der ein Signal als wirkliches Signal betrachtet werden kann. Je höher dieses Verhältnis ist, desto besser können die Daten ausgewertet werden. Mit einem Verhältnis von 126,1 zeigt die Microplate 384/V den größten Wert, d.h. das Signal kann am besten vom Hintergrundrauschen unterschieden werden. Das trifft auch für alle anderen getesteten ATP-Konzentrationen zu (Abb. 3). Werte des Z'-Faktors zwischen 0,5 und 1 zeigen einen robusten Assay mit zuverlässigen Daten an, wobei Z'=1 für den idealen Assay steht [4]. Den höchsten Z'-Faktor von 0,845 erreicht die Microplate 96/V.

**Tabelle 1:** Statistische Parameter

Die jeweils besten Werte pro Parameter sind dunkel unterlegt.

	Microplate 96/V	Microplate 96/U	Microplate 384/V
Nachweisgrenze (LOD)	1,113 nM	2,387 nM	0,333 nM
Variationskoeffizient %CV bei 10 nM	2 %	4 %	5 %
Signal-Rausch-Verhältnis bei 10 nM	39,2	18,4	126,1
Z'-Faktor bei 10 nM	0,845	0,702	0,820



**Abbildung 3:** Signal-Rausch-Verhältnis der ATP Standardkonzentrationen für die Eppendorf Microplates 96/V, 96/U and 384/V.

Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, dass auch bei einer niedrigen ATP-Konzentration von 10 nM zuverlässige Daten mit allen weißen Eppendorf Microplates generiert werden können. Die geringste Streuung der Daten und die beste Assayqualität wird mit der Microplate 96/V erzielt. Die V-Boden Microplate 96 zeigt eine signifikant niedrigere Nachweisgrenze und ein zweifach höheres Signal-Rausch-Verhältnis im Vergleich zur U-Boden Microplate 96. Die sehr niedrige LOD, die die Microplate 384/V zusammen mit

dem höchsten Signal-Rausch-Verhältnis aufweist, gibt an, dass diese Platte besonders geeignet ist, wenn mit niedrig konzentrierten Proben gearbeitet wird. Beim Vergleich der Performance von schwarzen und weißen Platten in diesem Assay wurde gezeigt, dass auch schwarze Microplates eingesetzt werden können (Daten nicht gezeigt). Die weißen Platten weisen allerdings eine deutlich höhere Signalintensität auf.

## Fazit

Die weißen Eppendorf Polypropylen Microplates zusammen mit dem Promega CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay stellen sich als zuverlässiges und sensibles System zur Quantifizierung von ATP in einem großen Konzentrationsbereich dar. Alle drei Typen der analysierten weißen Microplates wiesen eine exzellente Performance

bezüglich Qualität, Nachweisgrenze und Signal-Rausch-Verhältnis vor. Die V-Boden Eppendorf Microplates 96 und 384 zeigten die höchste Sensitivität in diesem Lumineszenzassay und sind daher besonders für gering konzentrierte Proben geeignet.

## Referenzen

- [1] Eppendorf Application Note 203: Eppendorf Polypropylen Microplates – Höchste Sensitivität bei Fluoreszenzmessungen in schwarzen Platten (<http://www.eppendorf.de>)
- [2] Technical Bulletin #288 – CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (<http://www.promega.com>)
- [3] Mocak J, Bond AM, Mitchell S, Scollary G. A statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: Application to voltametric and stripping techniques. *IUPAC, Pure Appl Chem* 1997, 69: 297-328.
- [4] Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen* 1999; 4 (2):67-73.

**Eppendorf Bestellinformationen**

<b>Eppendorf Microplates*, 80 Platten (5 Beutel à 16)</b>				
<b>Bezeichnung</b>	<b>Qualität</b>	<b>Wellfarbe</b>	<b>Umrandungs- farbe</b>	<b>Bestell-Nr.</b>
Microplate 96/U-PP	PCR clean	schwarz	weiß	0030 601.807
Microplate 96/U-PP	PCR clean	weiß	grau	0030 601.572
Microplate 96/V-PP	PCR clean	schwarz	weiß	0030 601.904
Microplate 96/V-PP	PCR clean	weiß	grau	0030 601.670
Microplate 384/V-PP	PCR clean	schwarz	weiß	0030 621.905
Microplate 384/V-PP	PCR clean	weiß	grau	0030 621.670

\*Alle Microplates sind auf Anfrage mit Barcode und in größeren Verpackungseinheiten erhältlich.

**Promega Bestellinformationen**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bestell-Nr.</b>
Promega CellTiter-Glo® Assay, 10 ml	G7570
Promega CellTiter-Glo® Assay, 10x10 ml	G7571
Promega CellTiter-Glo® Assay, 1x100 ml	G7572
Promega CellTiter-Glo® Assay, 10x100 ml	G7573
Promega 10 mM rATP, 500 µl	P1132

Safire<sup>2</sup> ist eine geschützte Marke der Tecan Group Ltd.

CellTiter-Glo ist eine geschützte Marke der Promega Corporation

PicoGreen ist eine geschützte Marke von Molecular Probes, Inc.



**eppendorf**  
*In touch with life*

Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH · Deutschland · Tel: +49 2232 418-0 · Fax: +49 2232 418-155 · E-mail: [vertrieb@eppendorf.de](mailto:vertrieb@eppendorf.de)

Eppendorf Austria · Österreich · Tel: +43 1 29017560 · Fax: +43 1 290175620 · E-mail: [office@eppendorf.at](mailto:office@eppendorf.at)

Vaudaux-Eppendorf AG · Schweiz · Tel: +41 61 482 1414 · Fax: +41 61 482 1419 · E-mail: [vaudaux@vaudaux.ch](mailto:vaudaux@vaudaux.ch)

**Application Support** Tel: +49 1803 666 789 · E-mail: [support@eppendorf.com](mailto:support@eppendorf.com)