

(19)



Bureau voor de
Industriële Eigendom
Nederland

(11) 1010224

(12) C OCTROOI²⁰

(21) Aanvraag om octrooi: 1010224

(51) Int.Cl.⁷
C12Q1/66

(22) Ingediend: 30.09.1998

(41) Ingeschreven:
31.03.2000

(47) Dagtekening:
31.03.2000

(45) Uitgegeven:
05.06.2000 I.E. 2000/06

(73) Octrooihouder(s):
Packard Bioscience B.V. te Groningen.

(72) Uitvinder(s):
Harry van Lune te Groningen
Jan ter Wiel te Loppersum

(74) Gemachtigde:
Mr. Ir. A.W. Prins c.s. te 2508 DH Den Haag.

(54) Werkwijze voor het detecteren van ATP.

(57) De uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor het detecteren van ATP in een monster, waarbij het monster in aanraking wordt gebracht met een reactiemengsel teneinde een lichtsignaal te veroorzaken, waarbij het reactiemengsel luciferine, luciferase, en één of meer in water oplosbare zouten omvat, waarbij de totale zoutconcentratie ten minste 0,05 mol/liter bedraagt, en waarbij het lichtsignaal wordt gemeten. De uitvinding heeft voorts betrekking op een kit voor toepassing in deze werkwijze.

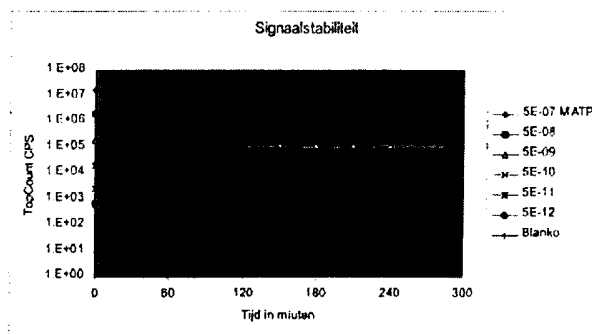


Fig 4

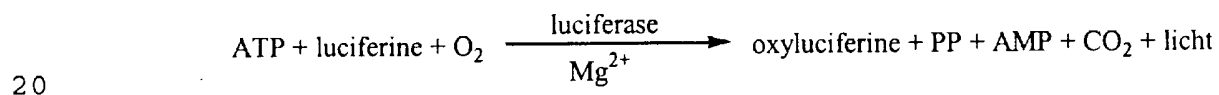
Titel: Werkwijze voor het detecteren van ATP

De uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor het detecteren van ATP en op een kit voor toepassing in deze werkwijze.

Een bekende werkwijze voor het detecteren van ATP (adenosinetrifosfaat) maakt gebruik van bioluminescentie. Bekend is de bioluminescentie van luciferase/luciferine-organismen, waarbij luciferine wordt omgezet in oxyluciferine. Deze omzetting wordt gekatalyseerd door het enzym luciferase.

10. Een bekend luciferase is afkomstig van de vuurvlieg, *Photinus pyralis*. Dit luciferase is een enzym dat een molecuulgewicht heeft van ongeveer 60.000 dalton en ongeveer 550 aminozuren bevat. Het substraat voor dit enzym is luciferine, eveneens afkomstig van de vuurvlieg. Dit is
15 een polyheterocyclisch organisch zuur, D-(-)-2-(6'-hydroxy-2'-benzothiazolyl)- Δ^2 -thiazoline-4-carbonzuur.

Aangenomen wordt dat de luciferase-gekatalyseerde bioluminescentie-reactie als volgt verloopt:



Hierin staan PP voor pyrofosfaat en AMP voor adenosinemonofosfaat. Het oxyluciferine wordt aanvankelijk geproduceerd in een aangeslagen toestand. Wanneer de stof
25 terugkeert naar zijn grondtoestand, gaat dat gepaard met de emissie van licht.

Wanneer ATP in een medium aanwezig is, kan men middels de luciferine-luciferase reactie de hoeveelheid ATP bepalen. Wanneer men ATP, of een medium dat ATP bevat,
30 toevoegt aan een samenstelling die luciferine, luciferase, magnesiumionen en zuurstof bevat, verkrijgt men, afhankelijk van de gekozen samenstelling van de reagentia, een kortdurend intens lichtsignaal. Gedurende enkele seconden kan men spreken van een relatief stabiel

lichtsignaal. Men neemt aan dat de afname in de snelheid van de reactie wordt veroorzaakt door een product-inhibitie.

Wanneer men een monster dat ATP bevat, middels een injectiesysteem aan de samenstelling die de reagentia voor de luciferine-luciferase reactie bevat, toevoegt, kan men de concentratie ATP in het monster bepalen. Het nadeel van de meetsystemen is dat, bij gebruik van een microtiterplaat, elk putje afzonderlijk, dus putje voor putje, moet worden gemeten. Dit is een bijzonder tijdrovend karwei. Wanneer aan een aantal reactievaten, of putjes van microtiterplaten een monster dat ATP bevat, wordt toegevoegd en er vervolgens wordt gemeten, zal het lichtsignaal van de laatste vaten of putjes die worden gemeten reeds geheel of grotendeels verdwenen zijn.

Het heeft daarom de voorkeur om een relatief stabiel lichtsignaal te verkrijgen in de luciferine-luciferase reactie. Wanneer het lichtsignaal gedurende langere tijd stabiel is, kan men gebruik maken van plaatluminometers waarbij een injectiesysteem overbodig is. Bovendien kan men dan een groot aantal reactievaten of microtiterplaten voorbereiden en pas enige tijd later het lichtsignaal gaan meten. Het lichtsignaal blijft dan maatgevend voor de hoeveelheid ATP in de diverse monsters.

De uitvinding beoogt een methode voor het bepalen van de concentratie van ATP met behulp van de luciferine-luciferase reactie te verschaffen, waarbij de duur van de lichtemissie tijdens de reactie significant wordt verlengd.

In de literatuur zijn reeds vele pogingen beschreven om de duur van het lichtsignaal in de luciferase-reactie te beïnvloeden en verlengen.

Eén benadering die de kinetiek van de luciferine-luciferase reactie beïnvloedt en de tijd van de lichtemissie verlengt, maakt gebruik van een inhibitor voor het luciferase-enzym. Een voorbeeld van een inhibitor die veel aandacht heeft gekregen, is arsenaat. Arsenaat

verlaagt de intensiteit van de flits en verlengt tevens de lengte ervan. De gevoeligheid van de reactie voor het detecteren van ATP wordt echter eveneens minder. Ook is het gebruik van arsenaat vanuit milieu-oogpunt minder gewenst.

5 Bovendien wordt de afname van de intensiteit van het lichtsignaal onwenselijk geacht, met name bij gebruik van microtiterplaten of instrumenten die strips kunnen aflezen.

De kinetiek van de luciferine-luciferase reactie is bestudeerd door DeLuca et al. in *Analytical Chemistry*, 95, 10 194-198, 1979. De effecten van het toevoegen van arsenaat en andere ionen is door de auteurs weergegeven. Een bezwaar bij de voorgestelde werkwijze is echter het niet-lineaire verband van de afname van de lichtintensiteit over een breed concentratiegebied van ATP-bepaling.

15 In het Amerikaanse octrooischrift 5.618.682 wordt een werkwijze beschreven voor het detecteren van luciferase, waarbij een reactiemengsel wordt gebruikt dat ATP omvat. Het reactiemengsel bevat, behalve ATP, adenosinemonofosfaat, een radicaalvanger (DTT), 20 dithiothreitol en een chelerend middel (EDTA). Tevens wordt een protease-inhibitor toegepast, zoals fenylazijnzuur.

Een andere benadering kiest voor het gebruik van co-enzym A (CoA). Airth et al. hebben in *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 27 (1958), 519-532 beschreven dat het 25 toevoegen van CoA aan een luciferine-luciferase reactiemengsel geen effect heeft op de lichtflits, maar dat de intensiteit van het lichtsignaal na de flits gedurende langere tijd op een hoger niveau blijft.

Deze benadering wordt ook gekozen in het Amerikaanse 30 octrooischrift 5.650.289. Hierin worden technieken en samenstellingen van reactiemengsels voorgesteld, die de kinetiek van de luciferine-luciferase reactie beïnvloeden. De beschreven technieken zijn gebaseerd op het gebruik van CoA en DTT. De halfwaardetijd van het lichtsignaal, dus de 35 tijd waarna 50% van het oorspronkelijke lichtsignaal wordt waargenomen, wordt bepaald op 300 tot 500 seconden.

Het Amerikaanse octrooischrift 4.246.340 stelt eveneens een methode voor om een halfwaardetijd van het lichtsignaal in een luciferine-luciferase reactie te verkrijgen van enkele minuten. De beschreven werkwijze is gebaseerd op het gebruik van inhibitors, zoals D-luciferine analoga. Een voorbeeld hiervan is L-luciferine.

Zoals gezegd, beoogt de onderhavige uitvinding een verbeterde werkwijze te verschaffen voor het detecteren van ATP met behulp van de luciferine-luciferase reactie, waarbij een lichtsignaal wordt verkregen dat significant langer duurt dan in de stand der techniek is beschreven. Daarnaast is het een doel van de uitvinding dat de beoogde werkwijze eenvoudig is en uitgevoerd kan worden in een putje van een microtiterplaat.

Verrassenderwijs is gevonden dat de gestelde doelen worden bereikt door de luciferine-luciferase reactie uit te voeren in aanwezigheid van relatief grote hoeveelheden anionen en kationen, afkomstig van toegevoegde zouten. De anionen en kationen bewerkstelligen een niet-competitieve inhibitie van het luciferase-enzym, waardoor de duur van het lichtsignaal wordt verlengd tot een halfwaardetijd van ten minste 30 minuten, tot meer dan 8 uur.

De uitvinding betreft derhalve een werkwijze voor het detecteren van ATP in een monster, waarbij het monster in aanraking wordt gebracht met een reactiemengsel teneinde een lichtsignaal te veroorzaken, waarbij het reactiemengsel luciferine, luciferase, en één of meer in water oplosbare zouten omvat, waarbij de totale zoutconcentratie ten minste 0,05 mol/liter bedraagt, en waarbij het lichtsignaal wordt gemeten.

Bij de detectie van ATP volgens de uitvinding is gebleken dat het lichtsignaal dat optreedt in de luciferine-luciferase reactie, dus wanneer er ATP aanwezig is, een halfwaardetijd heeft van 30 minuten tot meer dan 8 uur. Hoewel ATP volgens de onderhavige werkwijze nauwkeurig en eenvoudig kan worden bepaald in elk geschikt type

houder, is gevonden dat de werkwijze bijzonder geschikt toegepast kan worden in de putjes van microtiterplaten of in vloeistofscintillatietellers.

Met luciferase wordt een enzym bedoeld, dat de
5 oxidatie van luciferine katalyseert, bij welke oxidatie een lichtsignaal wordt geproduceerd. Luciferase kan worden geïsoleerd uit organismen die luciferase produceren. Tevens kan luciferase worden gewonnen uit cellen die
getransformeerd of getransfecteerd zijn met een
10 polynucleotide dat een luciferase codeert. Bij voorkeur wordt een luciferase toegepast van de vuurvlieg *Photynus Pyralis*.

Onder luciferine wordt de stof D-(-)-2-(6'-hydroxy-2'-benzothiazolyl)- Δ^2 -thiazoline-4-carbonzuur verstaan.
15 Luciferine kan eveneens uit de natuur worden geïsoleerd. Het heeft echter de voorkeur om synthetisch bereide luciferine te gebruiken vanwege de toegankelijkheid en de hogere zuiverheid die deze vorm doorgaans heeft.

Zoals gezegd wordt volgens de uitvinding een
20 monster, waarvan men wil weten of het ATP bevat, in aanraking gebracht met een reactiemengsel dat luciferine, luciferase, en één of meer in water oplosbare zouten omvat.

In genoemd reactiemengsel zal luciferine doorgaans aanwezig zijn in een hoeveelheid tussen 0,01 en 1 mM, bij
25 voorkeur tussen 0,05 en 0,5 mM. Het enzym luciferase zal doorgaans aanwezig zijn in een hoeveelheid tussen 0,0003 en 0,05, bij voorkeur tussen 0,001 en 0,03 gram per liter van het reactiemengsel.

Bij voorkeur bevat het reactiemengsel tevens
30 magnesiumionen. De magnesiumionen zullen aanwezig zijn in een hoeveelheid van ten minste 0,0005 mol per liter. Doorgaans zal de hoeveelheid magnesiumionen niet groter zijn dan 0,2 mol per liter.

De totale hoeveelheid zouten die in het
35 reactiemengsel aanwezig is, bedraagt ten minste 0,05 mol/liter, en bij voorkeur ten minste 0,10 mol per liter.

Gevonden is dat de aanwezigheid van een grote hoeveelheid zouten leidt tot een verlenging van het lichtsignaal dat optreedt in de luciferine-luciferase reactie tot een half uur of meer.

5 De hoeveelheid zouten in het reactiemengsel hangt uiteraard af van de mate waarin de ionen van de zouten in staat zijn inhibitie van luciferase te veroorzaken. Voorts is van belang dat de zouten volledig in het reactiemengsel oplossen. De maximale hoeveelheid zouten die toegepast
10 wordt, zal derhalve met name worden bepaald door de oplosbaarheid van de gekozen zouten.

In beginsel komen alle in water oplosbare zouten in aanmerking. Voorbeelden van geschikte zouten zijn alkali- of aardalkalizouten van Cl^- , Br^- , SO_4^{2-} , HSO_4^- , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- ,
15 NO_3^- en HCO_3^- . Goede resultaten zijn verkregen met zoutoplossingen van Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 en NaCl . Bij voorkeur bedraagt de concentratie van NaCl in het reactiemengsel ongeveer 100 mM.

Naast de genoemde stoffen kan het reactiemengsel
20 alle gebruikelijke stoffen bevatten die worden toegepast in luciferine-luciferase reactiemengsels.

Bij voorkeur omvat het reactiemengsel tevens een geschikte buffer, zoals tricine, HEPES, HEPES, MOPS, Tris, CHAPS of een fosfaatzout. Bij voorkeur wordt HEPES of een
25 mengsel van de genoemde buffers gebruikt. Dergelijke buffers kunnen de pH op een geschikte waarde houden. Bij voorkeur wordt de pH gehouden tussen 6,5 en 8,2. De hoeveelheid van de buffer kan geschikt worden gekozen door de vakman en zal doorgaans liggen tussen 25mM en 1M.

30 Verder omvat het reactiemengsel bij voorkeur een stabilisator voor het luciferase. Geschikte voorbeelden van stabilisatoren zijn een serum albumine van een zoogdier, een lactalbumine en een ovalbumine. Bij voorkeur wordt Bovine Serum Albumine (BSA) gebruikt. De hoeveelheid van de
35 stabilisator zal onder 1 gew.%, betrokken op het gewicht van het reactiemengsel, liggen.

Het reactiemengsel omvat voorts bij voorkeur een sequestreermiddel zoals EDTA of CDTA. Een dergelijke stof is bij voorkeur aanwezig in een hoeveelheid van 0,1 en 10 mM.

5 Het monster dat in aanraking wordt gebracht met hierboven beschreven reactiemengsel kan in beginsel ieder monster zijn waarvan men wil weten of het ATP bevat. Het ATP kan bijvoorbeeld in opgeloste vorm aanwezig zijn in een bufferoplossing.

10 In bepaalde gevallen zal het monster biologisch van aard zijn, bijvoorbeeld afkomstig van een celweekculture. Levende cellen bevatten zoald bekend ATP. Indien het
.. monster cellen bevat, dient het monster vooraf een cellyse te ondergaan om het in de cellen aanwezige ATP vrij te
15 maken en te kunnen detecteren. De hoeveelheid ATP is een maat voor de hoeveelheid aanwezige cellen.

Een probleem bij het detecteren van ATP in een monster dat cellen bevat, is dat cellen doorgaans ATP consumerende enzymen zoals ATP-ases bevatten, die het te
20 detecteren ATP afbreken en aldus de meting verstoren. Volgens de uitvinding is gevonden dat de storende werking van eventuele ATP-ases kan worden opgeheven door de cellyse uit te voeren in een alkalisch milieu, bij voorkeur onder toepassing van een niet-ionisch detergens,. Bijzonder
25 geschikte lyserende detergenten zijn nonylfenoxypolyethoxyethanol (Triton N101®) en Triton X-100 gebleken.

Voordat de onderhavige uitvinding werd gedaan, varieerde de afname van het lichtsignaal bij het bepalen
30 van ATP middels de luciferine-luciferase reactie van een aantal procenten per minuut tot een afname tot de helft van het oorspronkelijke lichtsignaal binnen één minuut. De snelle afname van lichtemissie van de bioluminescentie-reactie om ATP te bepalen heeft ertoe geleid dat gebruik
35 van bepaling van ATP om bijvoorbeeld celaantallen te kwantificeren beperkt is gebleven, aangezien niet alleen

het lichtsignaal snel afneemt, maar tevens ATP-consumerende
enzymen het lichtemissie-patroon beïnvloeden en een nog
sneller afname van de lichtemissie veroorzaken. Middels de
genoemde cellyse, verschaft de onderhavige uitvinding
5 tevens voor dit probleem een oplossing.

Teneinde de cellyse uit te voeren, wordt het monster
in aanraking gebracht met een lyserende oplossing. Deze
oplossing bevat het lyserende detergens in een hoeveelheid
van, bij voorkeur, 0,1 tot 10 gram per liter. De pH van de
10 oplossing ligt bij voorkeur boven 9,5, bij bijzondere
voorkeur boven 10, en kan geschikt ingesteld worden met een
base zoals natriumhydroxide. De incubatietijd nodig om de
cellyse uit te voeren kan de vakman geschikt kiezen op
basis van zijn vakkennis.

15 Na de cellyse wordt het monster in aanraking
gebracht met het bovenbeschreven reactiemengsel. Deze stap
wordt uitgevoerd in aanwezigheid van zuurstof, bijvoorbeeld
aan de lucht. Bij voorkeur worden zowel de eventuele
cellyse als de luciferine-luciferase reactie uitgevoerd in
20 een putje van een microtiterplaat. Hiertoe worden bij
voorkeur 100 µl van het, eventueel opgeloste, monster en
50 µl van het cellysemengsel, gevolgd door 50 µl van het
reactiemengsel samengebracht.

Zodra het monster in aanraking is gebracht met het
25 reactiemengsel, zal, indien er ATP in het monster aanwezig
is, een lichtsignaal worden uitgezonden. Dit lichtsignaal
geeft een maat voor de hoeveelheid ATP die in het monster
aanwezig is. Indien het monster cellen bevat, kan de
hoeveelheid ATP worden beschouwd als maat voor de
30 hoeveelheid levende cellen die in het monster aanwezig
waren.

Het meten van het lichtsignaal en het aan de hand
daarvan kwantificeren van de hoeveelheid ATP kan op elke
bekende wijze worden uitgevoerd. Men kan hierbij gebruik
35 maken van instrumenten als de TopCount (Packard) of de
Lumicount (Packard), dan wel van andere plaatluminometers

die zijn ingericht om microtiterplaten te meten. Eveneens kunnen zogenaamde stripluminometers worden toegepast of luminometers voorzien van injectiesystemen. Tevens kunnen vloeistofscintillators worden toegepast en andere
5 instrumenten die het niveau kunnen meten van het verkregen lichtsignaal.

Om de reactiekinetiek van de luciferine-luciferase reactie tijd te geven om te stabiliseren, wacht men bij voorkeur enige tijd na het samenbrengen van het monster en
10 het reactiemengsel alvorens te gaan meten. Deze tijd kan geschikt worden bepaald door de vakman en zal doorgaans .. liggen tussen 5 en 15 minuten.

De uitvinding heeft tevens betrekking op een kit voor toepassing in de bovenbeschreven werkwijze voor het
15 detecteren van ATP.

Vanwege hun geringe stabiliteit zijn luciferase en luciferine bij voorkeur in gevriesdroogde vorm aanwezig in de kit. Om deze vorm te bereiken kan men als volgt te werk gaan. Een mengsel van de gewenste hoeveelheden luciferase
20 en luciferine wordt opgelost in een buffer, bijvoorbeeld een PBS buffer. Bij voorkeur wordt hieraan tevens een kleine hoeveelheid van een stabilisator, zoals BSA, toegevoegd. De aldus verkregen samenstelling kan worden gevriesdroogd in aanwezigheid van een gebruikelijke
25 hulpstof, zoals trehalose.

Naast het beschreven mengsel van luciferine en luciferase, bij voorkeur in gevriesdroogde vorm, omvat de kit volgens de uitvinding een bufferoplossing, die de overige bestanddelen van het bovenbeschreven reactiemengsel
30 bevat. In een voorkeursuitvoeringsvorm omvat de kit tevens de bovenbeschreven lyserende oplossing.

De uitvinding zal thans nader worden toegelicht aan de hand van de volgende voorbeelden.

Voorbeeld 1:

Testgevoeligheid en lineariteit ATPLite-M kit.
Verdunningsreeks U937 (Humaan Promyelocyt), HeLa (Humaan
5 Cervixcarcinoma), en CHO (Chinese Hamster Ovarium) cellen.

U937 cellen werden gekweekt in RPMI medium aangevuld met Foetaal Kalf Serum (FKS) tot 10% eindconcentratie.
HeLa cellen werden gekweekt in Dulbecco's Modified Eagles
10 Medium (DMEM) aangevuld FKS tot 10% eindconcentratie. CHO cellen werden gekweekt in een 1:1 mengesel van DMEM) en Ham's F12 medium aangevuld met FKS tot 5% eindconcentratie in een 37°C incubator in een 5% CO₂ atmosfeer.

Adherente CHO en HeLa cellen werden gewassen met PBS
15 zonder calcium- en magnesiumzouten. De cellen werden losgemaakt van het kweeksubstraat door incubatie met een dunne laag 1:10 verdunde commercieel verkrijgbare trypsine-EDTA-oplossing en vervolgens verzameld in kweekmedium+FKS. U937 suspensie cellen werden 5 minuten gecentrifugeerd bij
20 500 x g in een 50 ml Falcon buis. De celpellet werd opgenomen in vers kweekmedium. De celtiter werd bepaald met behulp van een Coulter Counter door telling van een 1:20 verdunning van de verzamelde celsuspensies in een isotone oplossing.

25 Seriële verdunningen van de celsuspensies werden bereid in kweekmedium+FKS. Uitgaande van celsuspensies met een titer van 781250 cellen per milliliter werden 1:5 verdunningen bereid zodat een verdunningsreeksen werden verkregen met resp. 781250, 156250, 31250, 6250, 1250, 250
30 en 50 cellen per milliliter. 100 microliter cel suspensies werden gepipeteerd in de putjes van een 96-wells microtiterplaat. Na twee uur incubatie in een broedstoof werden de cellen gelyseerd door aan elk van de putjes 50 microliter Mammalian Cell Lysis Solution (oplossing D van
35 voorbeeld 4) toe te voegen en de lysaten twee minuten te schudden op een schudplateau. Hierna werd 50 microliter

ATP-M buffer (oplossing E van voorbeeld 4) aan elk putje toegevoegd waardoor de ATP afhankelijke luciferase-luciferine reactie gestart werd. Na een uur incubatie werd de intensiteit van het vrijkomende licht in elk putje
 5 bepaald met behulp van een Packard TopCount. De resultaten zijn weergegeven in Figuren 1, 2 en 3.

Uit Figuren 1, 2 en 3 blijkt dat er, ongeacht welke cellijn gemeten werd, een lineaire (cor)relatie bestaat tussen het aantal cellen dat zich in elk putje bevindt en de
 10 bijbehorende gemeten lichtsterkte (uitgedrukt in counts per second). Deze resultaten laten zien dat het aantal cellen aanwezig in een te bemonsteren putje nauwkeurig bepaald kunnen worden door de gemeten lichtsterkte aan een standaardlijn te relateren. Voorts blijkt dat de gemeten
 15 lichtsterkte over een wijde bandbreedte van celaantallen rechtevenredig is met het aantal cellen.

Legenda bij figuur:

20 Lineariteit ATPLite-M assay bij gebruik van diverse cellijnen. Een verdunningsreeks van cellen werd bereid uit een celsuspensie. Cellen (0; 5; 25; 125; 625; 3125; 15625; 78125) werden toegevoegd aan putjes van een 96-wells plaat. Na twee uur incubatie werd 50 µl lysis oplossing toegevoegd.
 25 Na lysis werd 50 µl assay substraat buffer toegevoegd. Lichtintensiteit werd gemeten met behulp van een Packard TopCount. Figuur geeft op dubbel log-schaal de relatie tussen het cel aantal (x-as) en de gemeten lichtintensiteit (in counts per second (CPS, y-as) weer. De stippellijn in
 30 elke grafiek geeft het achtergrond niveau van de assay aan.

De volgende voorbeelden /experimenten laten zien dat met een eenvoudige formulering een lichtsignaal kan worden
 35 verkregen dat in de tijd langzaam afneemt. Het signaal is evenredig met de concentratie ATP in het te meten mengsel.

Voorbeeld 2

Hiertoe werd een verdunningsreeks (1: 10) gemaakt van ATP in water gaande van 1E-06 M tot en met 1E-11 M
 5 ATP. Aan 100 μ l van elk van deze ATP oplossingen werd 100 μ l oplossing A toegevoegd in putjes (wells) van een witte 96-wells microplate en het lichtsignaal herhaaldelijk in de tijd gemeten op een Packard TopCount gedurende 4 uren.

10

Formulering Oplossing A:

	HEPES	50 mM
	EDTA	4 mM
	MgCl ₂	10 mM
15	NaCl	260 mM
	BSA	1.50 gram per liter
	Trehalose	5.0 gram per liter
	D-Luciferine	0.2 mM
	Luciferase	6 mg per liter

20

pH gesteld op 7.8 met NaOH

De uiteindelijke concentraties van de componenten van
 25 oplossing A en het ATP in het 1 op 1 mengsel van oplossing A en de ATP oplossingen worden in de putjes 2 maal lager als gevolg van het mengen van deze twee oplossingen.

De resultaten zijn als volgt:

	TopCount CPS (counts per second)						
	ATP concentratie in Mol per liter						
Tijd(minuten)	5.00E-07	5.00E-08	5.00E-09	5.00E-10	5.00E-11	5.00E-12	0
0	18775000	1982067	195134	20115	2553	742	505
15	17535000	1839266	181276	18525	2071	379	204
30	16785000	1757748	173262	17671	1975	353	177
60	15660000	1648084	162572	16667	1819	305	139
90	14700000	1553360	152886	15739	1676	305	135
120	13795000	1461522	144238	14641	1549	274	122
150	12955000	1376604	135801	13854	1505	261	117
180	12135000	1292035	127490	12934	1434	242	117
210	11455000	1222251	120558	12274	1350	234	113
240	10830000	1155314	114113	11587	1265	217	103

.. Uit de resultaten volgt dat het signaal lineair is
met de concentratie ATP en dat het signaal langzaam in de
5 tijd afneemt, het duurt meer dan 4 uren voordat het signaal
is afgenomen tot de helft van het signaal van de eerste
meting (zie ook fig 4).

Voorbeeld 3

10

 Hiertoe werd een verdunningsreeks (1: 10) gemaakt
van ATP in water gaande van $1\text{E}-06$ M tot en met $1\text{E}-11$ M
ATP. Aan $100\mu\text{l}$ van elk van deze ATP oplossingen werd $100\mu\text{l}$
oplossing B toegevoegd in putjes (wells) van een witte
15 96-wells microplate en het lichtsignaal herhaaldelijk in de
tijd gemeten op een Packard TopCount gedurende 9.5 uur.

Formulering Oplossing B:

	HEPES	175 mM
	EDTA	2 mM
5	MgCl ₂	2 mM
	NaCl	100 mM
	NaH ₂ PO ₄	75 mM
	BSA	1.5 gram per liter
	Trehalose	5.0 gram per liter
10	D-Luciferin	0.2 mM
	Luciferase	6 milligram per liter
..	Triton N-101	2.0 gram per liter

pH gesteld op 7.4 met NaOH

15

De uiteindelijke concentraties van de componenten van oplossing B en het ATP in het 1 op 1 mengsel van oplossing B en de ATP oplossingen worden in de putjes 20 maal lager als gevolg van het mengen van deze twee oplossingen.

De resultaten zijn als volgt:

	TopCount CPS (counts per second)						
	ATP concentratie in Mol per liter						
Tijd(minuten)	5.00E-07	5.00E-08	5.00E-09	5.00E-10	5.00E-11	5.00E-12	0
0	13350000	1347570	136270	14221	2091	524	376
30	12393333	1256867	127691	13369	1597	404	292
60	11700000	1192631	121205	12775	1533	384	320
90	11063333	1134309	115303	12177	1461	360	258
120	10500000	1079513	110011	11573	1380	355	241
150	9934357	1024827	104686	11020	1314	337	232
180	9475816	980343	100124	10504	1246	323	215
210	9031766	935826	95537	10113	1198	307	216
240	8632510	897371	91619	9647	1130	298	196
270	8256822	859530	87607	9299	1101	277	190
300	7912674	825082	84268	8927	1042	261	175
330	7572644	791870	80809	8531	1010	262	169
360	7250944	758263	77532	8193	959	247	164
390	6949015	727838	74190	7828	943	242	157
420	6660917	698798	71069	7471	901	219	157
450	6382937	671368	68224	7192	844	208	144
480	6118376	643632	65336	6928	820	209	139
510	5874066	618683	62905	6608	785	197	137
540	5638346	594449	60334	6366	750	179	127
570	5416984	571113	57747	6134	716	186	124

Uit de resultaten volgt dat het signaal lineair is met de concentratie ATP en dat het signaal langzaam in de tijd afneemt, de halfwaardetijd is in dit voorbeeld ca. 7 uur. (zie ook fig. 5)

Voorbeeld 4

Hiertoe werd een verdunningsreeks (1: 2) gemaakt van CHO (Chinese Hamster Ovary) cellen in Dulbecco's MEM aangevuld met Foetaal Kalf Serum (FKS) tot 10% eindconcentratie gaande van 37000 cellen per 100 μ l naar 36 cellen per 100 μ l in een witte "tissue culture treated" microplate. Aan 100 μ l van elke celverdunding werd 100 μ l oplossing C toegevoegd en het ATP afhankelijke lichtsignaal herhaaldelijk in de tijd gemeten op een Packard TopCount gedurende 9.5 uur.

Formulering Oplossing C:

	HEPES	175 mM
	EDTA	2 mM
	MgCl ₂	2 mM
5	NaCl	65 mM
	NaH ₂ PO ₄	75 mM
	BSA	1.5 gram per liter
	Trehalose	5.0 gram per liter
	D-Luciferin	0.2 mM
10	Luciferase	6 milligram per liter
	Triton N-101	2.0 gram per liter

pH gesteld op 7.4 met NaOH

15

De resultaten zijn als volgt:

	TopCourt CPS (counts per second)											
	Celaantal per 100µl DMEM, 10%FKS											
Tijd(minuten)	37000	18500	9250	4625	2313	1156	578	289	145	72	36	0
0	15960000	8418265	4754536	2402330	1231988	636875	333584	171599	90251	46440	25290	307
30	10543599	5818309	3514526	1829353	948150	494213	257975	133956	71035	36786	20003	232
60	7845328	4409567	2776537	1516077	798829	420828	220374	114631	61226	31897	17466	326
90	6081600	3499910	2300989	1304974	697804	371671	195253	101888	54620	28734	15716	384
120	4861105	2851444	1950778	1143700	619684	333162	176169	92174	49329	26481	14342	421
150	3969965	2354948	1672153	1011224	554333	301213	159991	83877	45045	24537	13194	478
180	3288088	1962123	1442805	899695	498440	273310	145935	76865	41211	23034	12292	557
210	2753856	1646775	1250622	803773	450312	249347	133912	70599	37878	21785	11425	601
240	2326726	1388681	1087504	720162	407623	227830	122869	64991	34916	20438	10603	652
270	1977520	1175021	946291	646642	368666	208627	112948	59850	32069	19261	9919	705
300	1689400	995294	825327	580632	335085	191058	103885	55207	29751	18112	9332	775
330	1451102	846160	719904	522876	304543	175235	95993	51077	27398	17061	8653	814
360	1250777	721240	628896	470600	277002	161169	88484	47213	25469	16006	8137	895
390	1082119	617318	550186	423884	252183	148175	81697	43773	23414	15137	7675	960
420	939287	529036	481362	382755	229965	136601	75596	40654	21879	14198	7186	996
450	817431	455126	421545	345867	209675	125485	70111	37690	20180	13248	6803	1037
480	712973	392617	369411	312679	191303	116137	64888	34819	18795	12439	6384	1079
510	622275	339440	323655	282342	174756	106854	60168	32401	17426	11603	6048	1100
540	544737	294403	283647	255059	159870	98720	56112	30079	16271	10952	5714	1157
570	478681	257095	249556	231073	146335	91334	52145	28072	15183	10261	5406	1181

20

Uit de resultaten blijkt dat het lichtsignaal correleert met het aantal cellen maar dat de afnamesnelheid

van het lichtsignaal afhankelijk is van het aantal cellen. De halfwaardetijd bij hoge celaantallen is ca. 1 uur. Deze tijd wordt langer naarmate er minder cellen aanwezig zijn. (zie ook fig. 6)

5

Door Oplossing C te splisten in twee delen, Oplossing D en Oplossing E en dezen achtereenvolgend toe te voegen aan een celsuspensie kan een systeem worden gemaakt waarvan de afnamesnelheid van het lichtsignaal

10 onafhankelijk is van het aantal cellen.

.. Formulering Oplossing D: Triton N-101 4 gram
per liter

NaOH 100 mM

15

Formulering Oplossing E: HEPES 350 mM

EDTA 4 mM

20

MgCl₂ 4 mM

NaCl 130 mM

NaH₂PO₄ 150 mM

BSA 3.0 gram per liter

Trehalose 10.0 gram per liter

25

D-Luciferin 0.4 mM

Luciferase 12 milligram per liter

pH gesteld op 7.4 met NaOH

30

Hiertoe werd een verdunningsreeks (1: 2) gemaakt van CHO (Chinese Hamster Ovary) cellen in Dulbecco's MEM aangevuld met Foetaal Kalf Serum (FKS) tot 10% eindconcentratie gaande van 37000 cellen per 100µl naar 36

35

cellen per 100µl in een witte "tissue culture treated" microplate. Aan 100µl van elke celverdunning werd 50µl

Oplossing D toegevoegd en de microplate ca. 2 minuten geschud. Vervolgens werd hieraan 50 μ l Oplossing E toegevoegd en nogmaals geschud. Het ATP afhankelijke lichtsignaal werd herhaaldelijk in de tijd gemeten op een

5 Packard TopCount gedurende 9.5 uur.

De resultaten zijn als volgt:

	TopCount CPS (counts per second)											
	Celaantal per 100 μ l DMEM, 10% FKS											
Tijd(minuten)	37000	18500	9250	4625	2313	1156	578	289	145	72	36	0
0	15926667	9265862	5064576	2701038	1377222	729482	377677	201242	107055	54417	30508	476
30	15266667	8565421	4633551	2466607	1258022	666151	345293	183669	96291	49516	27265	362
60	14260000	7866295	4254332	2273127	1159500	613956	317827	169234	88363	45655	25126	319
90	13343333	7273971	3934740	2107094	1075668	569032	294829	157511	81935	42201	23379	292
120	12473333	6749126	3655833	1961272	1001506	528935	274806	147387	76593	39225	22192	273
150	11666667	6267367	3398278	1822955	932186	492629	256308	137758	71842	36445	20962	260
180	10900000	5824752	3160377	1697725	868001	458433	239121	129036	67342	33961	20084	243
210	10170000	5425512	2944913	1582163	808965	426978	223166	120719	63158	31531	19098	229
240	9499379	5053815	2742458	1475159	754209	398221	208299	112792	59781	29540	18104	229
270	8881891	4709434	2555135	1373624	703270	370603	194672	105689	56624	27415	17170	228
300	8286678	4391574	2379784	1281135	656101	345122	181686	98815	53510	25638	16183	218
330	7753348	4097355	2220083	1195051	612369	322145	170040	92561	50709	23823	15318	221
360	7249262	3824937	2070513	1114717	571713	300295	158893	86465	48232	22270	14375	214
390	6782170	3572479	1932779	1040446	534360	280340	148864	81022	45735	20814	13719	212
420	6353719	3342239	1805662	973076	499430	262197	139251	76002	43376	19535	12818	220
450	5946932	3125245	1687138	908986	467072	244972	130067	71109	40732	18211	12120	211
480	5579366	2923640	1576153	849185	436177	228964	121946	66829	38820	17005	11397	209
510	5232171	2736005	1473761	793583	408269	214142	114224	62631	36733	15963	10582	213
540	4908614	2561487	1377321	742845	382487	200094	106784	58884	34706	14993	9992	210
570	4612006	2401882	1289080	695193	358281	187441	100059	55115	32806	14008	9323	212

10

Uit de resultaten volgt dat het lichtsignaal lineair correleert met het aantal cellen. Ook is nu de afnamesnelheid van het signaal onafhankelijk geworden van het aantal cellen. De halfwaardetijd is in dit voorbeeld

15 ca. 5 uur. (zie ook fig. 7)

CONCLUSIES

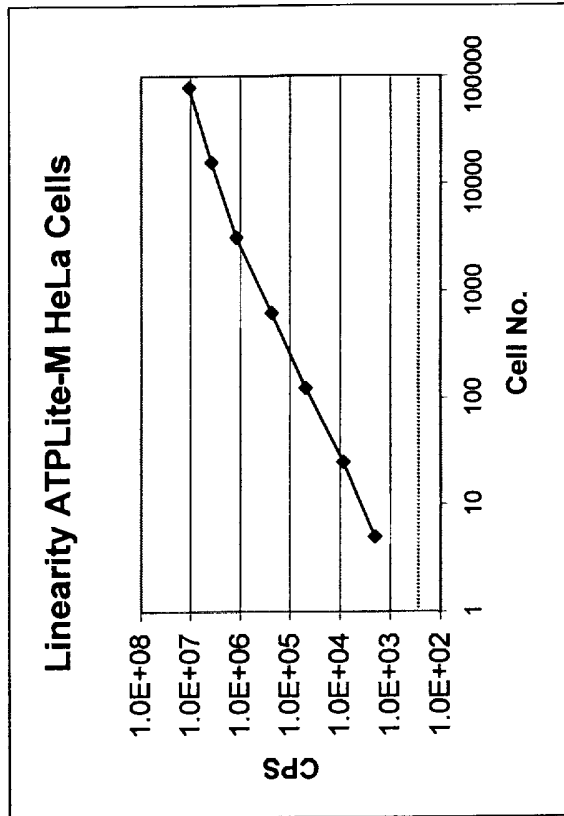
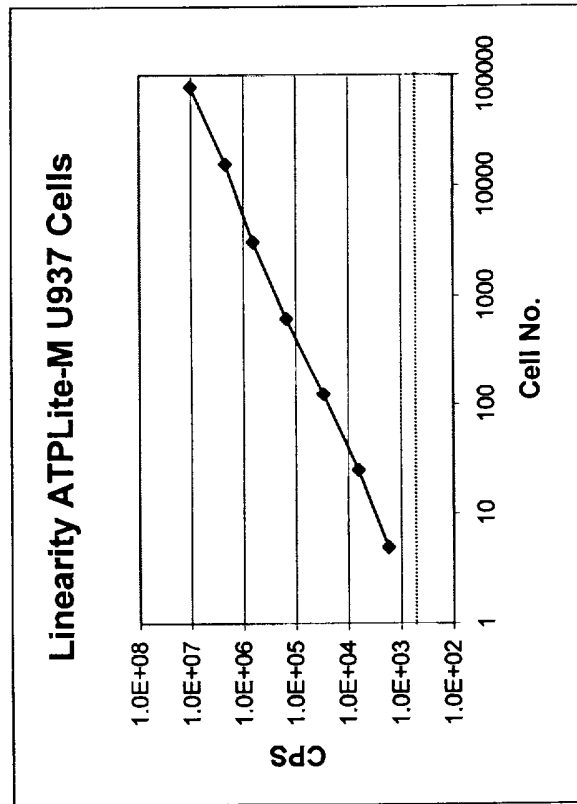
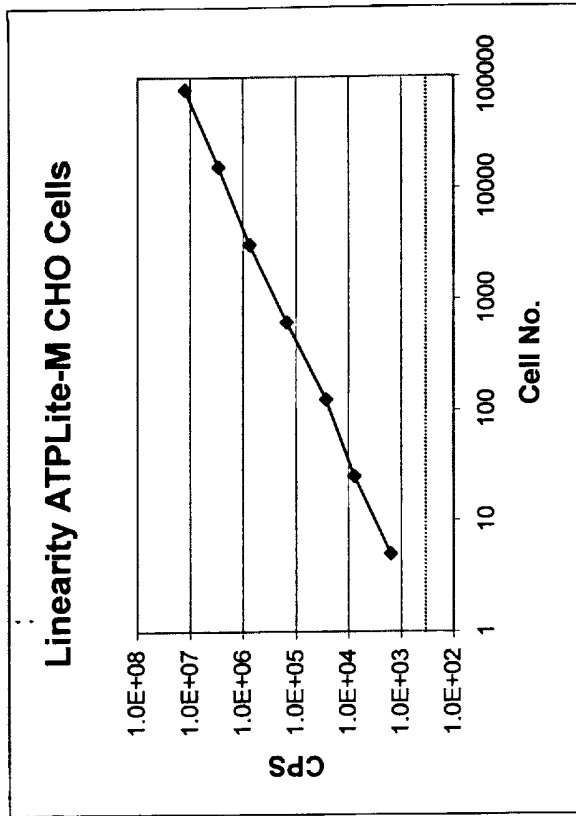
1. Werkwijze voor het detecteren van ATP in een monster, waarbij het monster in aanraking wordt gebracht met een reactiemengsel teneinde een lichtsignaal te veroorzaken, waarbij het reactiemengsel luciferine,
5 luciferase, en één of meer in water oplosbare zouten omvat, waarbij de totale zoutconcentratie ten minste 0,05 mol/liter bedraagt, en waarbij het lichtsignaal wordt gemeten.
2. Werkwijze volgens conclusie 1, waarbij de totale
10 zoutconcentratie ten minste 0,10 mol/liter bedraagt.
3. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2, waarbij de zouten worden gekozen uit alkali- of aardalkalizouten van Cl^- , Br^- , SO_4^{2-} , HSO_4^- , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- , NO_3^- en HCO_3^- .
4. Werkwijze volgens één van de voorgaande conclusies
15 waarbij het reactiemengsel tevens een buffer bevat, die het reactiemengsel op een pH tussen 6,5 en 8,2 houdt.
5. Werkwijze volgens één van de voorgaande conclusies, waarbij het monster cellen bevat, en waarbij de cellen vooraf worden onderworpen aan cellyse in een alkalisch
20 milieu.
6. Werkwijze volgens conclusie 5, waarbij de cellyse plaatsvindt onder toepassing van een lyserend detergens.
7. Werkwijze volgens conclusie 6, waarbij het lyserend detergens een niet-ionisch detergens is.
8. Werkwijze volgens conclusie 5-7, waarbij de cellyse
25 wordt uitgevoerd bij een pH groter dan 9,5.
9. Kit voor toepassing in een werkwijze volgens één van de voorgaande conclusies omvattende een mengsel van luciferine en luciferase en een bufferoplossing die zouten
30 omvat.
10. Kit volgens conclusie 9, waarbij het mengsel van luciferine en luciferase in gevriesdroogde vorm aanwezig is.

11. Kit volgens conclusie 10, die tevens een cellyse-oplossing omvat, welke oplossing een lyserend detergens omvat en een pH heeft boven 9,5.

12. Toepassing van een hoge zoutconcentratie voor het
5 verlengen van een lichtsignaal dat optreedt in een
luciferine-luciferase reactie.

U937	CHO	HeLa
0	0	0
5	5	5
25	25	25
125	125	125
625	625	625
3125	3125	3125
15625	15625	15625
78125	78125	78125
502	318.25	252.6675
1722.915	1556.085	1971.998
6380.638	7578.5	8531.585
29189.43	26254.65	48206.48
149682	149319	234005.5
646773.5	750981.3	1189373
2172693	2914204	3755821
102E+07	12402500	10523412

Fig. 1-3



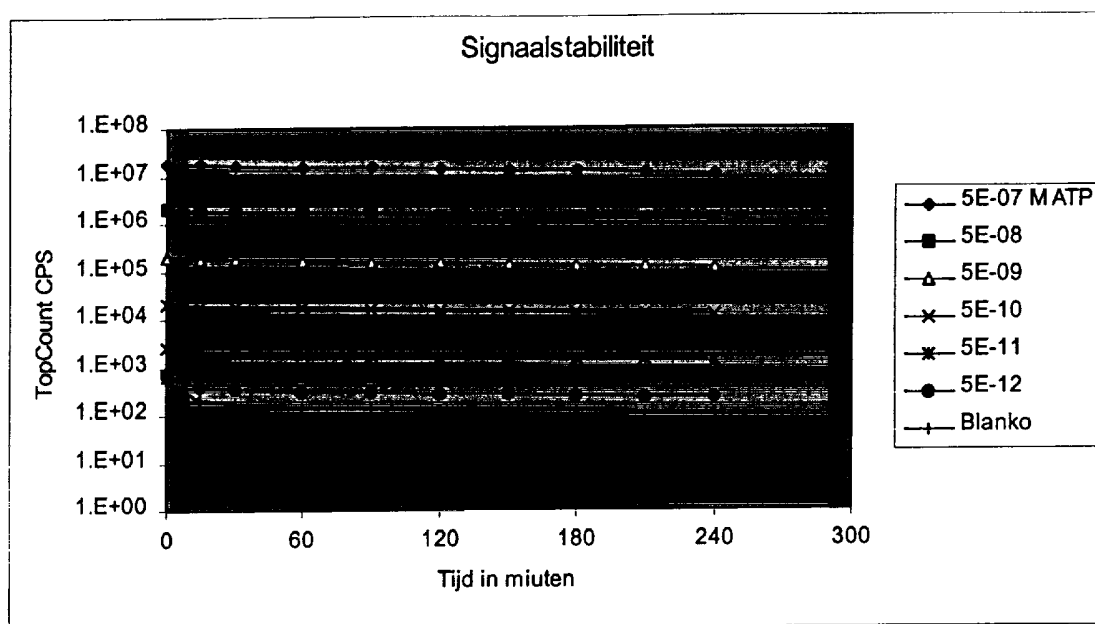


Fig 4

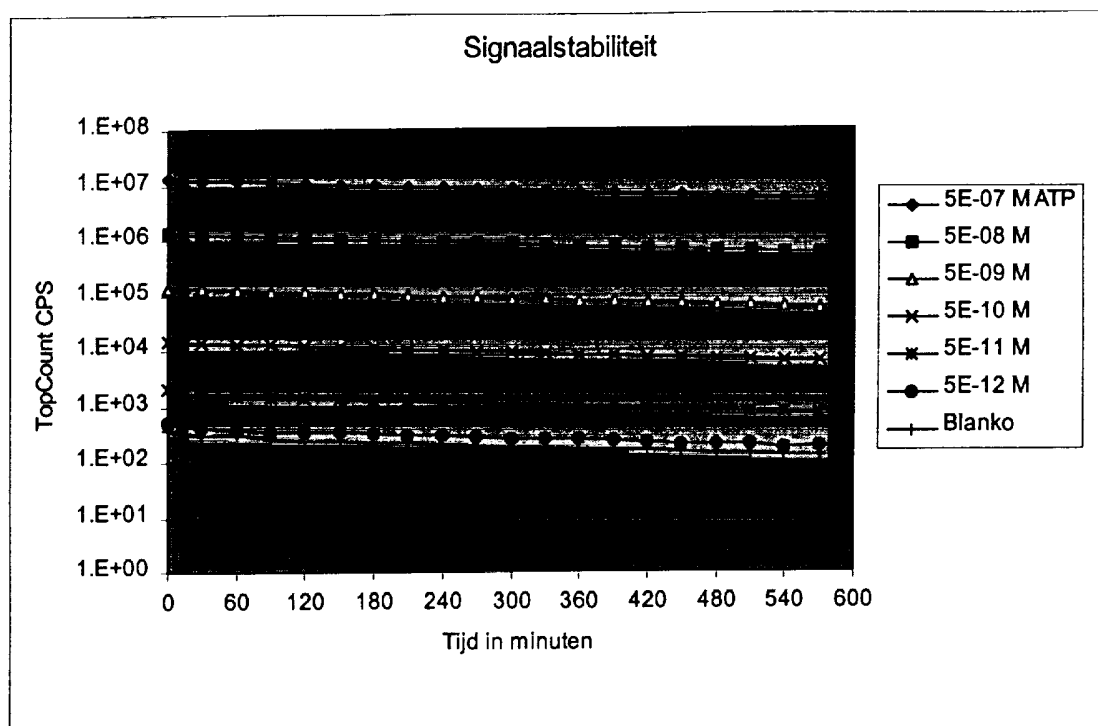


Fig 5

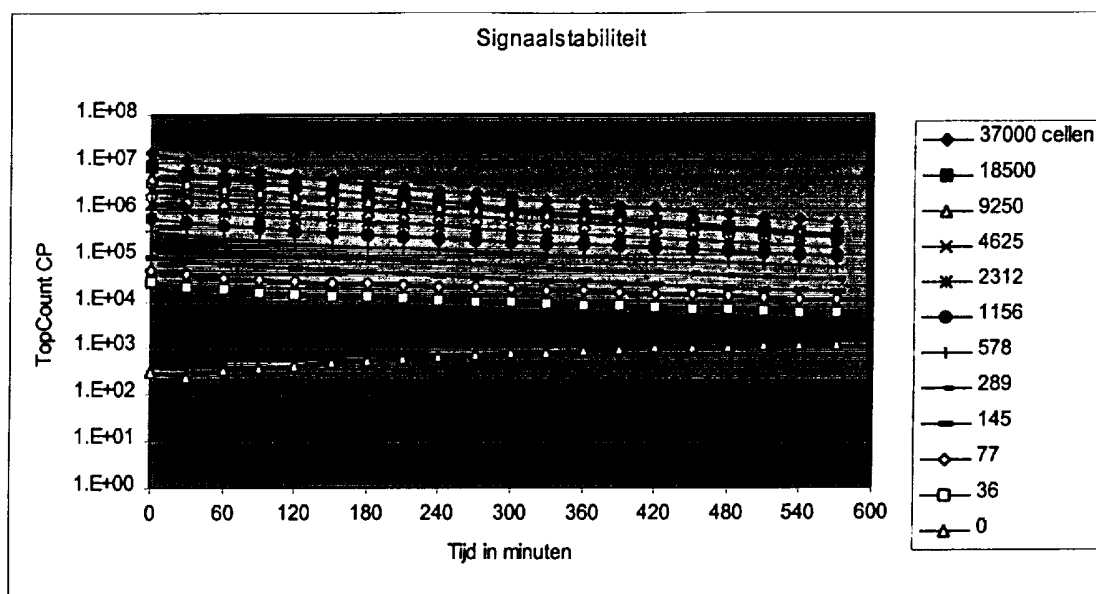


Fig 6

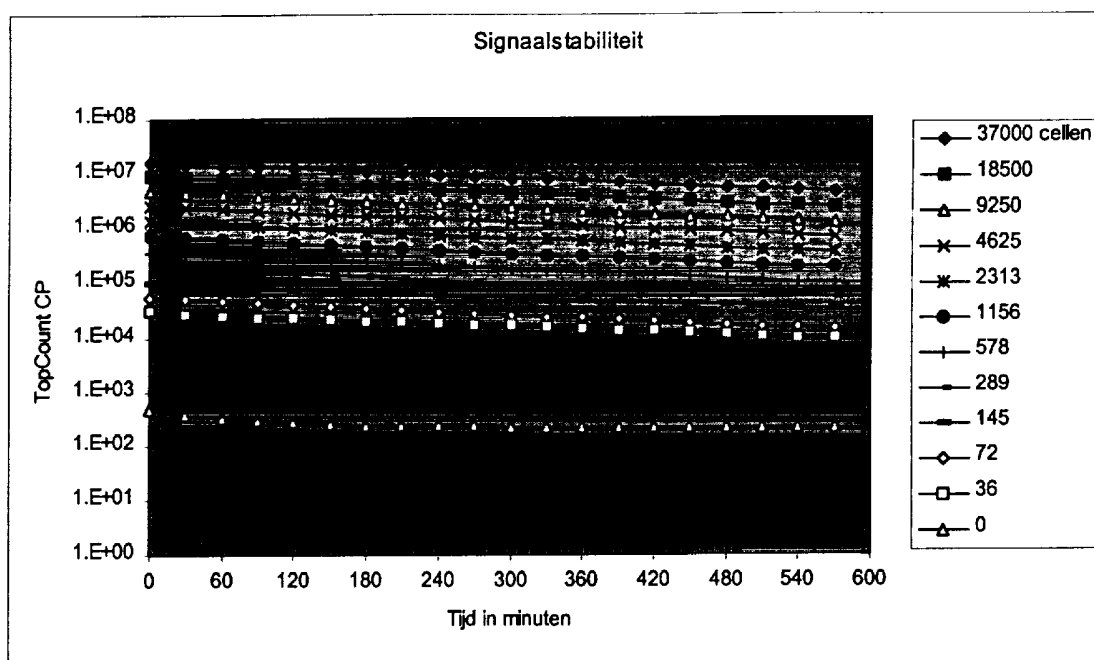


FIG 7

SAMENWERKINGSVERDRAG (PCT)
RAPPORT BETREFFENDE
NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN INTERNATIONAAL TYPE

IDENTIFIKATIE VAN DE NATIONALE AANVRAGE		Kenmerk van de aanvrager of van de gemachtigde Nw 2067	
Nederlandse aanvraag nr. 1010224		Indieningsdatum 30 september 1998	
		Ingeroepen voorrangsdatum	
Aanvrager (Naam) PACKARD BIOSCIENE B.V.			
Datum van het verzoek voor een onderzoek van internationaal type 23 februari 1999		Door de Instantie voor Internationaal Onderzoek (ISA) aan het verzoek voor een onderzoek van internationaal type toegekend nr. SN 32452 NL	
I. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP (bij toepassing van verschillende classificaties, alle classificatiesymbolen opgeven)			
Volgens de Internationale classificatie (IPC) Int.Cl. ⁶ : C 12 Q 1/66			
II. ONDERZOCHETE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK			
Onderzochte minimum documentatie			
Classificatiesysteem	Classificatiesymbolen		
Int.Cl. ⁶ :	C 12 Q, G 01 N		
Onderzochte andere documentatie dan de minimum documentatie voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen			
III. ☐ GEEN ONDERZOEK MOGELIJK VOOR BEPAALDE CONCLUSIES (opmerkingen op aanvullingsblad)			
IV. ☐ GEBREK AAN EENHEID VAN UITVINDING (opmerkingen op aanvullingsblad)			

VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN
INTERNATIONAAL TYPE

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek

NL 1010224

A. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP
IPC 6 C12Q1/66

Volgens de Internationale Classificatie van octrooien (IPC) of zowel volgens de nationale classificatie als volgens de IPC.

B. ONDERZOCHE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK

Onderzochte minimum documentatie (classificatie gevolgd door classificatiesymbolen)

IPC 6 C12Q G01N

Onderzochte andere documentatie dan de minimum documentatie voor dergelijke documenten, voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen

Tijdens het internationaal nieuwheidsonderzoek geraadpleegde elektronische gegevensbestanden (naam van de gegevensbestanden en, waar uitvoerbaar, gebruikte trefwoorden)

C. VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
Y	US 5 618 682 A (SCHEIRER WINFRIED) 8 April 1997 in de aanvraag genoemd zie kolom 1, regel 64 - kolom 2, regel 12; conclusies 1-3	1-12
Y	DENBURG J L ET AL: "ANION INHIBITION OF FIREFLY LUCIFERASE" ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, deel 141, nr. 2, 1 December 1970, bladzijden 668-675, XP000604348 zie het gehele document	1-12

☒ Verdere documenten worden vermeld in het vervolg van vak C.

☒ Leden van dezelfde octrooifamilie zijn vermeld in een bijlage

Speciale categorieën van aangehaalde documenten

'A' document dat de algemene stand van de techniek weergeeft, maar niet beschouwd wordt als zijnde van bijzonder belang

'E' eerder document, maar gepubliceerd op de datum van indiening of daarna

'L' document dat het beroep op een recht van voorrang aan twijfel onderhevig maakt of dat aangehaald wordt om de publikatiedatum van een andere aanhaling vast te stellen of om een andere reden zoals aangegeven

'O' document dat betrekking heeft op een mondelinge uiteenzetting, een gebruik, een tentoonstelling of een ander middel

'P' document gepubliceerd voor de datum van indiening maar na de ingeroepen datum van voorrang

'T' later document, gepubliceerd na de datum van indiening of datum van voorrang en niet in strijd met de aanvraag, maar aangehaald ter verduidelijking van het principe of de theorie die aan de uitvinding ten grondslag ligt

'X' document van bijzonder belang; de uitvinding waarvoor uitsluitende rechten worden aangevraagd kan niet als nieuw worden beschouwd of kan niet worden beschouwd op inventiviteit te berusten

'Y' document van bijzonder belang; de uitvinding waarvoor uitsluitende rechten worden aangevraagd kan niet worden beschouwd als inventief wanneer het document beschouwd wordt in combinatie met één of meerdere soortgelijke documenten, en deze combinatie voor een deskundige voor de hand ligt

'&' document dat deel uitmaakt van dezelfde octrooifamilie

Datum waarop het nieuwheidsonderzoek van internationaal type werd voltooid

23 Juni 1999

Verzenddatum van het rapport van het nieuwheidsonderzoek van internationaal type

Naam en adres van de instantie

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040 Tx 31 651 epo nl
Fax (+31-70) 340-3016

De bevoegde ambtenaar

Hart-Davis, J

VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN
INTERNATIONAAL TYPE

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek

NL 1010224

C (Vervolg) VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN		
Categorie	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr
A	DELUCA M ET AL: "PURIFICATION AND PROPERTIES OF FIREFLY LUCIFERASE" METHODS IN ENZYMOLOGY, deel 57, 1 Januari 1978, bladzijden 3-15, XP000563609 zie bladzijde 3 - bladzijde 5 zie bladzijde 14, regel 35, alinea 3 - regel 38 ---	1-12
A	US 5 744 320 A (SHERF BRUCE A ET AL) 28 April 1998 zie conclusies 1-5 -----	1-12

VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN

INTERNATIONAAL TYPE

Informatie over leden van dezelfde octrooifamilie

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek

NL 1010224

In het rapport genoemd octrooi geschrift		Datum van publicatie	Overeenkomend(e) geschrift(en)	Datum van publicatie
US 5618682	A	08-04-1997	AT 401526 B	25-09-1996
			AT 24393 A	15-02-1996
			EP 0610937 A	17-08-1994
			US 5866348 A	02-02-1999
US 5744320	A	28-04-1998	AU 6108996 A	30-12-1996
			CA 2221522 A	19-12-1996
			EP 0833939 A	08-04-1998
			WO 9640988 A	19-12-1996