



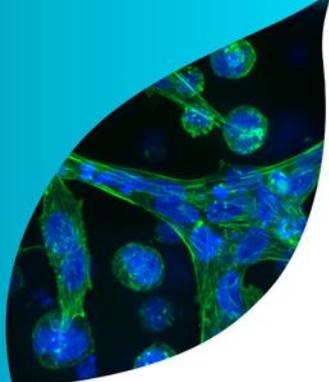
MOLECULAR
DEVICES



SpectraMax iD5 多功能酶标仪培训

Xiaoyan Wu | Application Scientist

September 2020



30+ Years of Innovation

Our rich research history and in-depth product knowledge helped impact the evolution and advancement of the scientific community.



1983

Founder: Harden McDonnell
from Stanford



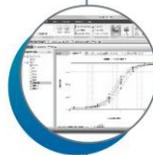
1986

First plate reader sold: Out of the
cuvette and into a 96-well plate



1995

FLIPR; high throughput screening
GPCRs launched



1997

SoftMax Pro launched: automated data
analysis for multi-detection applications



2005

ImageXpress Micro, automated high
content imaging for research & screening



2010

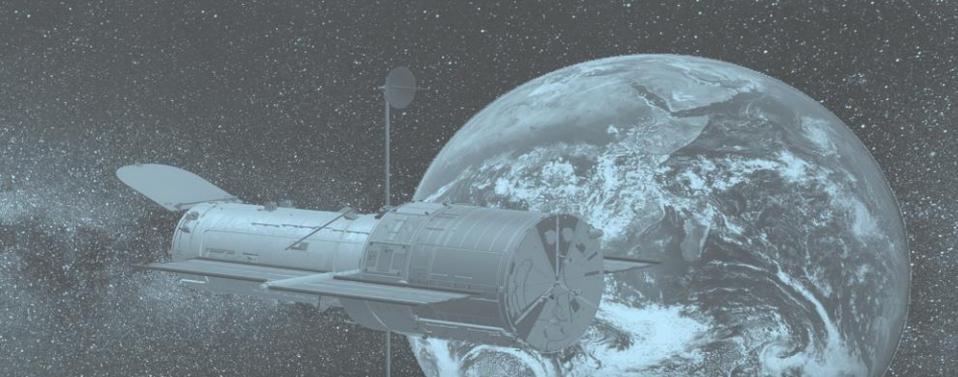
Danaher: Molecular Devices Acquisition

Our Customers

Our customers span the spectrum of life science research in various sectors—pharma, biotech, universities, and government. In nearly every research lab across the globe, you will find a Molecular Devices system.

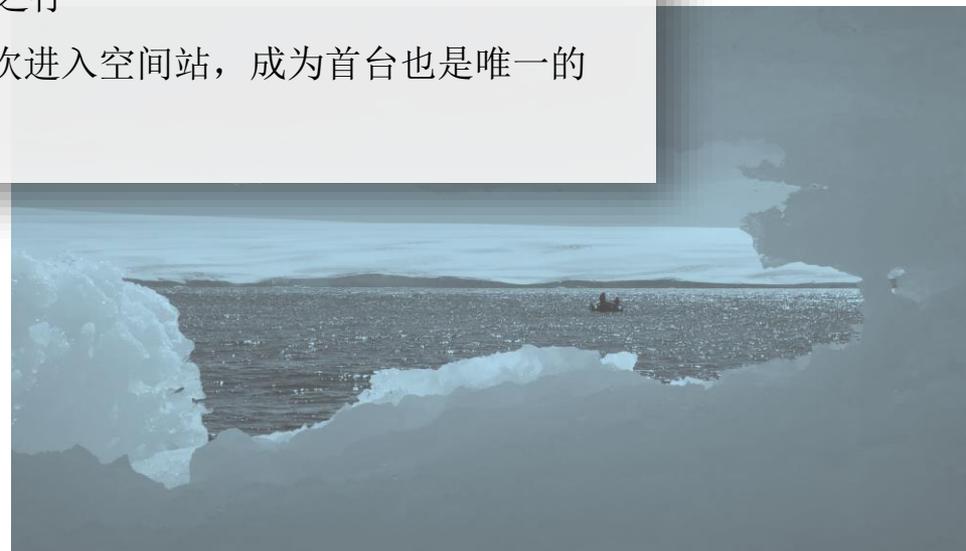
Our in-depth product experience combined with an intimate knowledge of our customer requirements have translated into market-leading solutions.



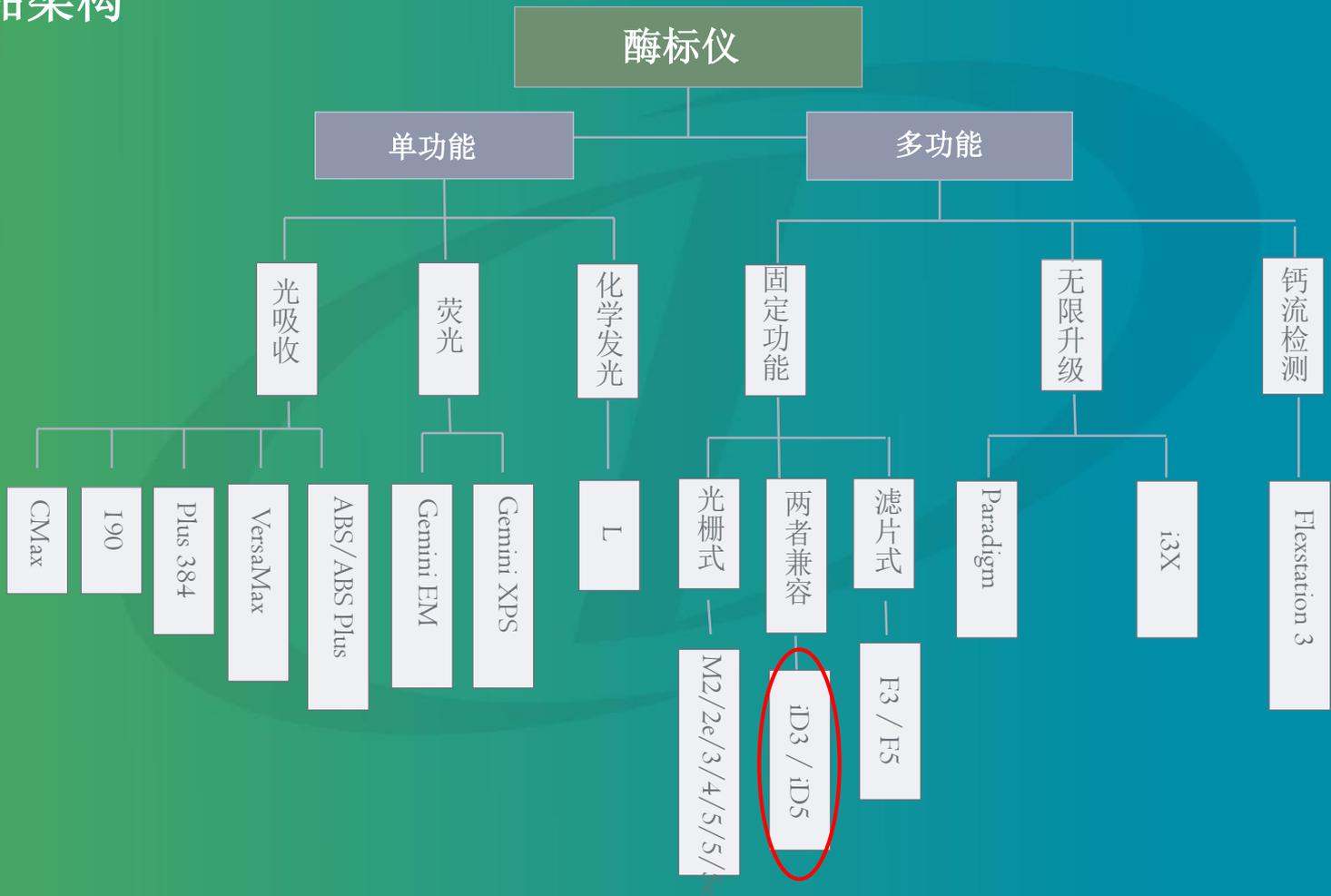


“上天入地”的酶标仪

- 2008年8月，SpectraMax M2南极洲之行
- 2011和2016年，SpectraMax M5e两次进入空间站，成为首台也是唯一的进入太空的酶标仪~



产品架构





2

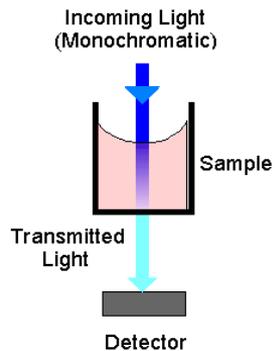
基本结构

Fundamental Structure

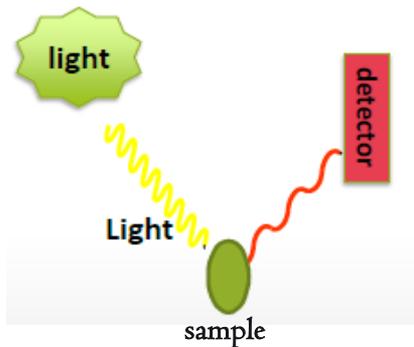


酶标仪—检测光信号的仪器

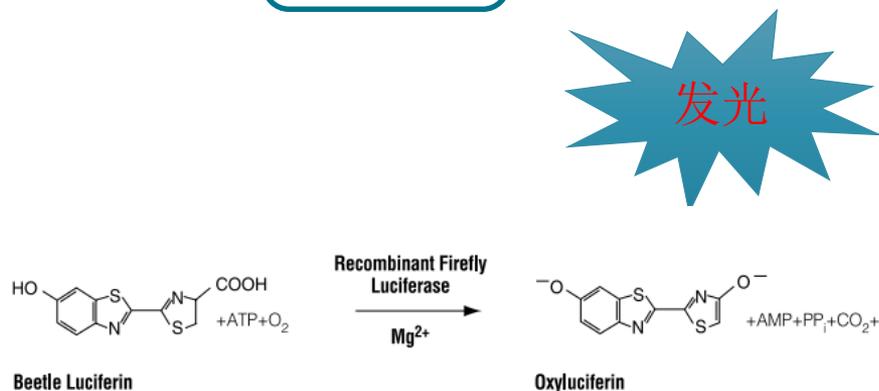
光吸收



荧光



化学发光

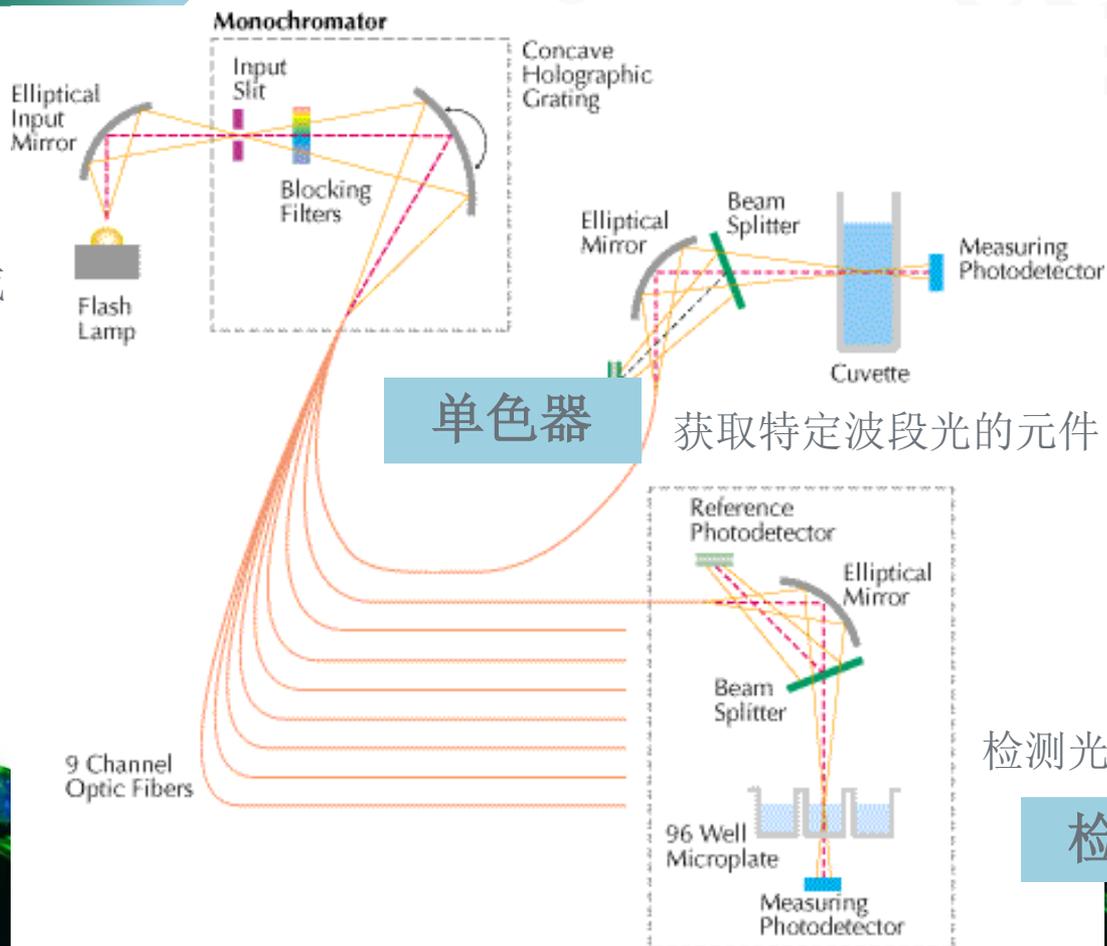


无论实验如何设计和操作，不变的是如何将测量的样品量与光信号强度形成对应关系，而微孔板读板机就是用来解决光信号的获取和分析

光路的基本结构

光源

提供混色光或单色光来源



单色器

获取特定波段光的元件

检测光强度的元件

检测器

主要硬件

- ✓ 卤素灯
- ✓ 氙闪灯
- ✓ LED灯
- ✓ 激光

光源

- ✓ 滤光片
- ✓ 光栅

单色器

- ✓ 光电二极管
- ✓ 光电倍增管

检测器

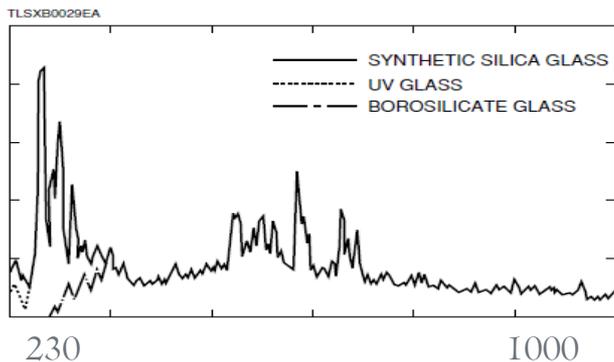
- ✓ 自动移液
- ✓ 注射器
- ✓ 气体控制

机械结构

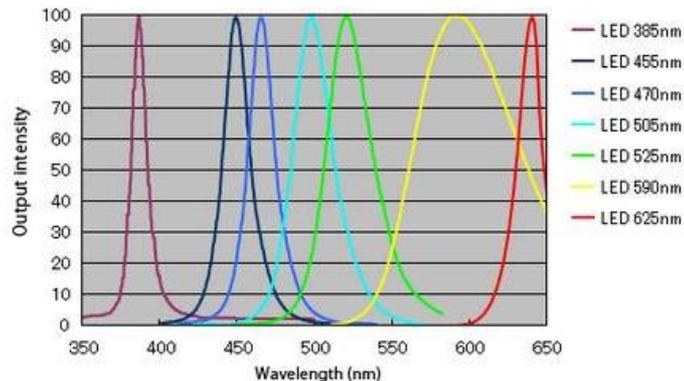
光源

卤素灯、氙闪灯、LED、激光光源

氙闪灯



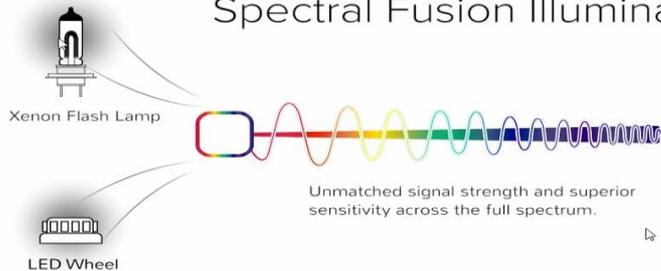
LEDs



LED 特征光谱

融合光源

Spectral Fusion Illumination



i3x

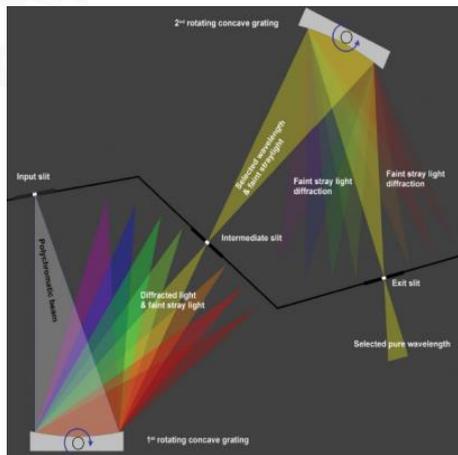
各种光源在MD酶标仪上的使用



- 卤素灯 CMax Plus
 - ✓ 寿命自动侦测功能
 - ✓ 价格低
- 高能氙灯（大多数中到高端酶标仪）
 - ✓ 只有当读孔的时候才闪灯
 - ✓ 仪器开着不减少灯的寿命
 - ✓ 十亿次闪烁寿命
 - ✓ 相当于终点法检测一百多万块微孔板
- LED i3x 光谱融合技术
 - ✓ 每个波段都有较高能量
 - ✓ 寿命极长 >10000 h
 - ✓ 纯度较高
- 激光 i3x Alpha 检测，1W 固体激光器
 - ✓ 能量高且集中
 - ✓ 单色性好

单色器——光栅

- 衍射狭缝
- 透射光栅
- 发射光栅
- 单光栅
- 双光栅
- 四光栅



光栅

优点：连续波长

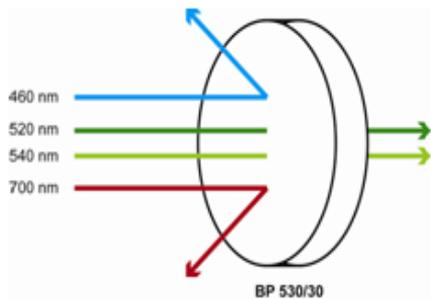
不足：通光率30%左右



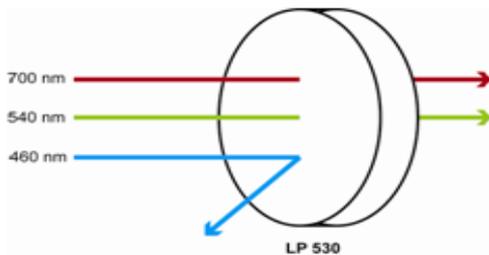


单色器——滤光片

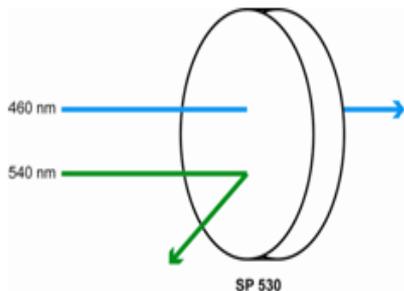
带通滤光片



长通滤光片



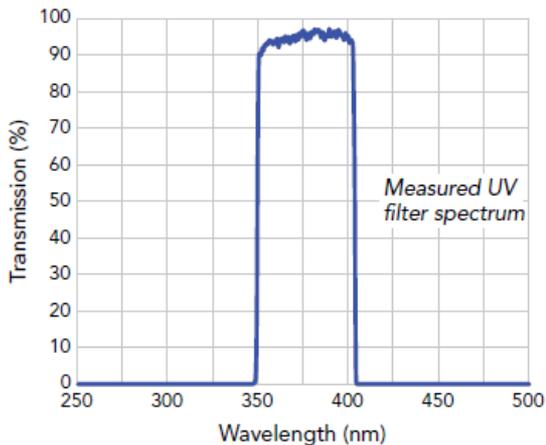
短通滤光片



滤光片

优点：通光率70-90 %左右

不足：波长不连续



双光栅+滤光片

M系列

Wavelength Settings

Number of wavelength pairs

Excitation

Emission Cutoff

Emission

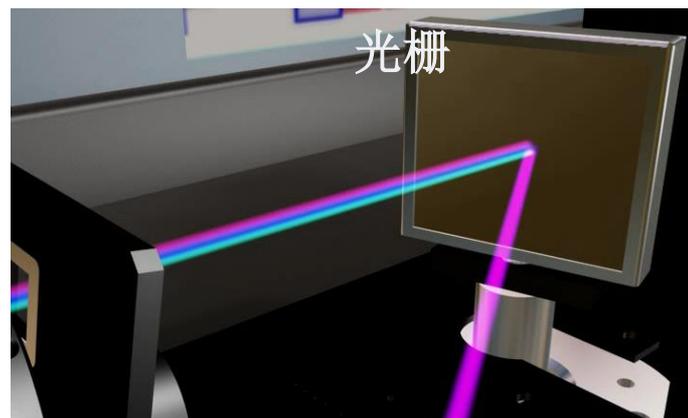
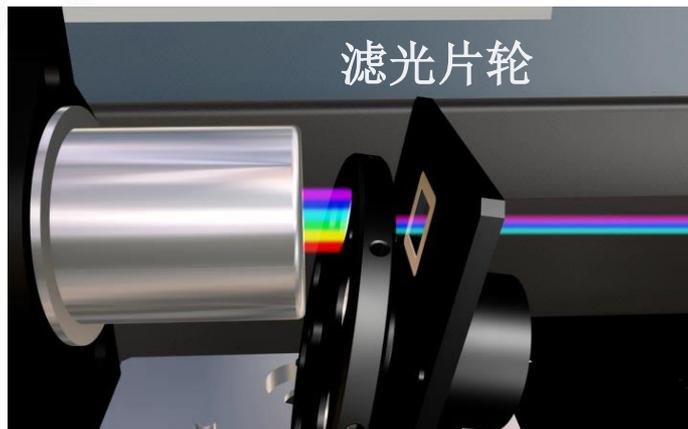
Auto Cutoff

Lm1 nm

nm

Type wavelength values in the field(s). Auto Cutoff sets cutoffs based on the emission wavelength chosen for reading.

[More Information](#)



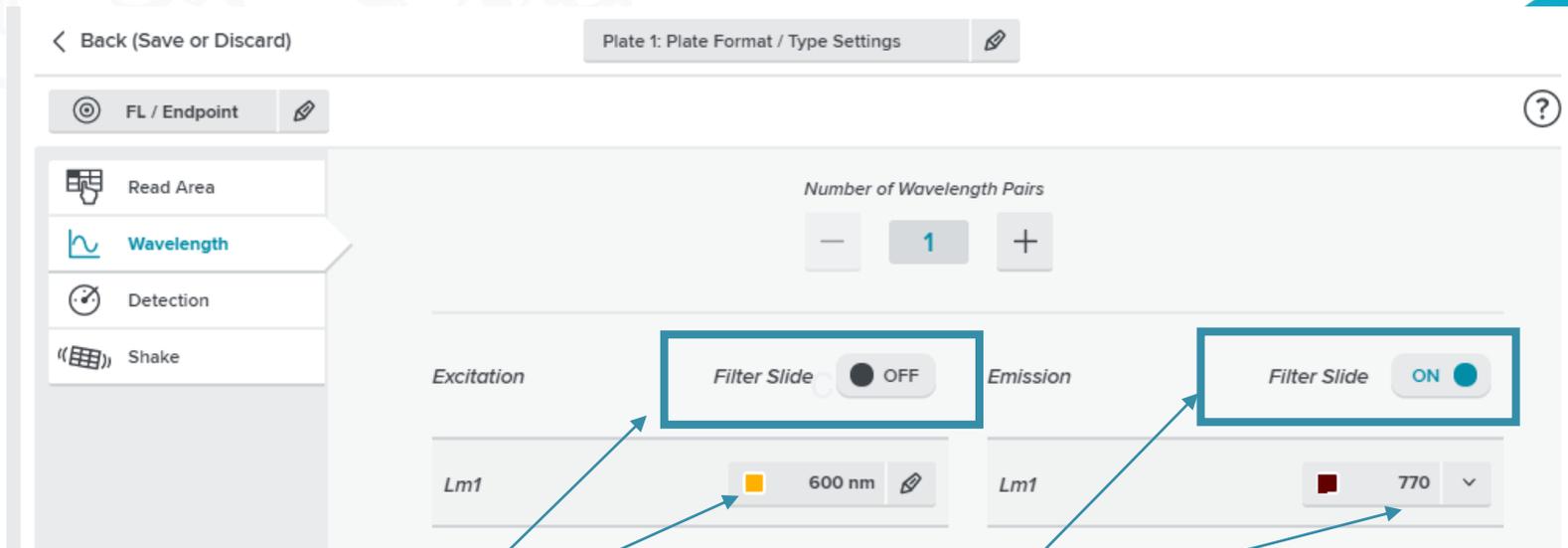


iD系列：双光路（四光栅+滤光片）



灵敏，灵活的数据获取：双光路

- 单独使用光栅，单独使用滤光片，或者结合两者一起使用



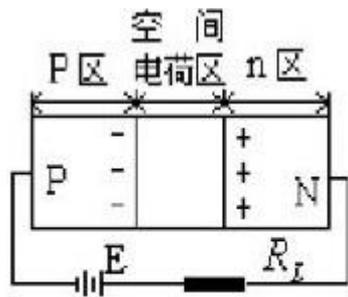
选择光栅

选择滤光片

检测器——光电二极管

- 光电二极管是将光信号转变成电信号的半导体器件。
- 核心部位是一个PN结，为了便于接受入射光照，PN结面积尽量做的大一些。
- 光电二极管是在反向电压作用之下工作的。没有光照时，反向电流极其微弱，称为暗电流。有光照时，反向电流迅速增大到几十微安，称为光电流。光的强度越大，反向电流也越大。光的变化引起光电二极管电流变化，这就可以把光信号转换成电信号。

广泛用于吸光度检测

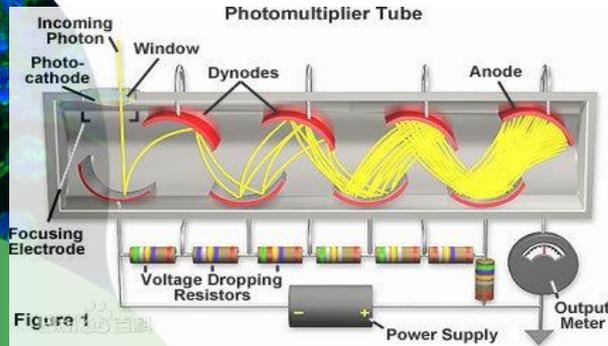


a 反向偏压工作状态

检测器——光电倍增管

- 光电倍增管(Photomultiplier, 简称PMT)

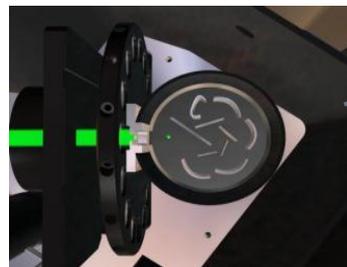
- 是一种能将微弱的光信号转换为可测量的电信号的光电器件。
- 主要结构包含光阴极、多个倍增极和阳极，当光照射光阴极，产生光电效应，光阴极发射出光电子，经过聚集和加速打到第一倍增极上，产生更多的二次电子，二次电子又入射到第二倍增极上..... 一般经十次以上倍增，电子数目达到可测量的程度，最后，在高电位的阳极收集到放大的光电流。输出电流和入射光子数成正比，整个过程时间约 10^{-8} 秒。
- 广泛用于荧光检测。



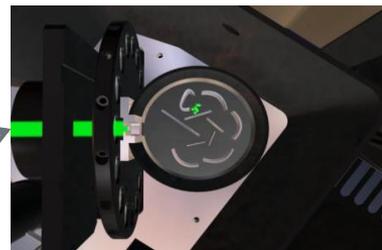
PMT自动增益——Auto PMT

- PMT自动增益调节
 - 仪器自动调节PMT两极的电压(*Gain*, 增益因子)
 - 自动判断样品信号强度, 选择合适的PMT电压
 - 所获得的数据是经校正的结果, 具有一致性、可比性

一个光子入射不同增益进行信号放大



低增益



高增益



Category

Wavelengths
Plate Type
Read Area
PMT and Optics
Shake
More Settings

PMT and Optics Settings

PMT Gain Automatic ▾
Flashes per read Automatic
Read From Bottom
High
Medium
Low
Manual

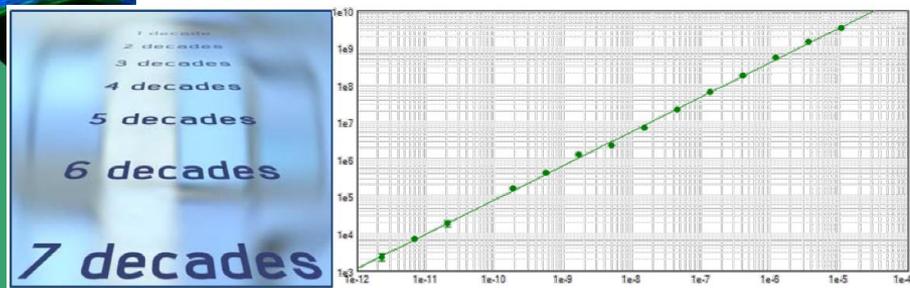
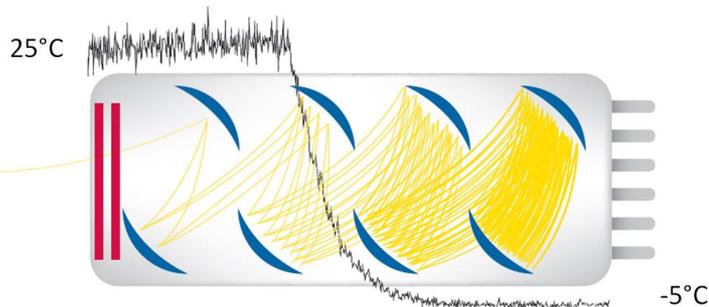
灵敏度和信噪比优化

Ultra Cooled PMT 检测器

- ✓ 5°C for super-cooled i3x PMT
- ✓ -5°C for ultra-cooled iD3 PMT
- ✓ -5°C for ultra-cooled iD5 PMT



噪声主要来源
热电子的发射





3

其他机械结构

Other Mechanical Structures



双通道注射器

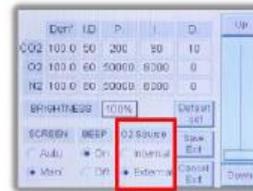
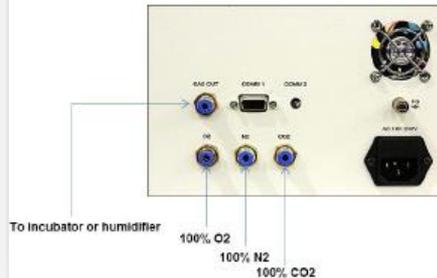
- ❖ 用户可自行安装
- ❖ 支持超快闪光型发光实验
- ❖ Dual Luciferase (DLR 认证)
- ❖ 管路总体积250uL，回流低死体积 <10uL
- ❖ 管路避光，因此也非常适合避光保存的试剂
- ❖ 具备防溢流、防气泡独特探测功能
- ❖ 注射器触摸屏控制
- ❖ 流程式操作





- CO2 range 0 ~ 20%
- Oxygen range 0 ~ 100%
- nitrogen range 0 ~ 100%
- Flow rate range Max. 200ml/min
- Physical dimension (mm) 210 (W) x 260 (D) x 140 (H)
- CO2 sensor NDIR
- Flow meter Digital mass flow control
- Voltage 100 ~ 230 V

Back panel





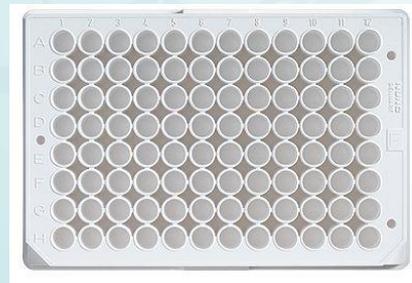
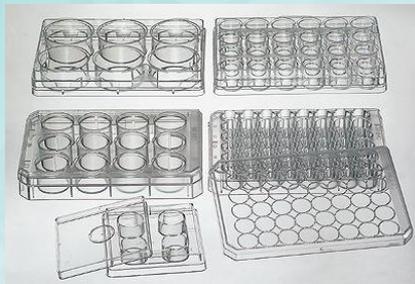
4

耗材选择与仪器养护

Consumables Selection and Instruments
Maintenance



耗材的选择



纯白板

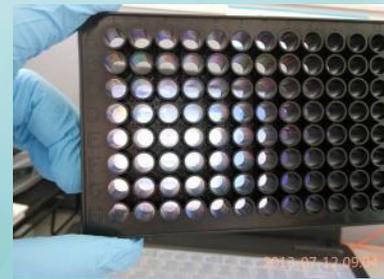
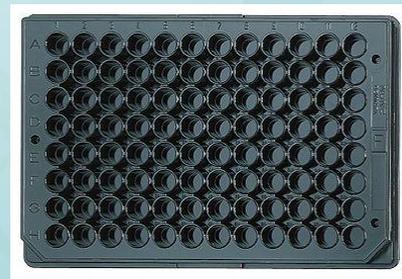
通常用于化学发光，TRF，HTRF等物激发光干扰的实验技术



全透明板

通常用于光吸收实验使用的耗材

底部非石英材质的板子不能直接用来对核酸和蛋白进行定量



纯黑板（均相溶液） 黑边底透板（贴壁细胞）

通常用于荧光实验，包括荧光偏振和能量共振转移

仪器保养与维护



- 仪器保养
 - 有良好的电源。
 - 保持避光和干净的室内环境，维持一定的湿度(30%-80%)。
 - 维持室内比较恒定的温度，以20-22 度为最适宜。
 - 96 孔板内每孔可检测100-300ul 溶液，最佳检测体积为200ul。
 - 384 孔板内每孔可检测50-100ul 溶液，最佳检测体积为80ul。
 - 检测样品中如果有腐蚀性或挥发性溶液，请带盖检测。

仪器保养与维护

- 仪器维护
 - 表面清洁：切断电源，使用稍微蘸水的布或海绵定期清洁仪器的外表面
 - 内部清洁：需要硬件工程师协助





5

检测技术原理

Principle of Detection Technology



主流的酶标仪检测技术



光吸收Abs(Absorbance)



荧光FL(Fluorescence)



发光LUM (Luminescence)



时间分辨荧光TRF



荧光偏振FP



多标记检测(FRET/TR-FRET/BRET)



Alpha(AlphaScreen, AlphaLisa)

光吸收检测

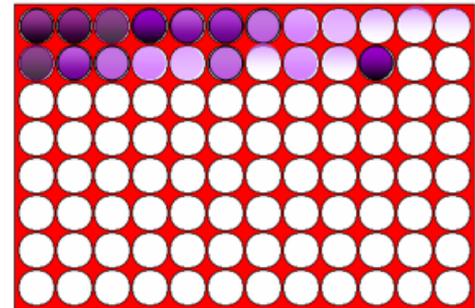
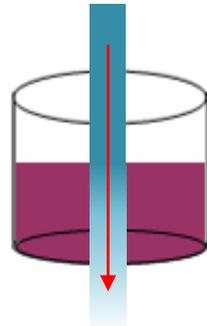
Absorbance

- 检测样品对**特定波长**光的吸收
- 光强减弱程度=待测样品的吸光度值

$$Absorbance = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon * c * b$$

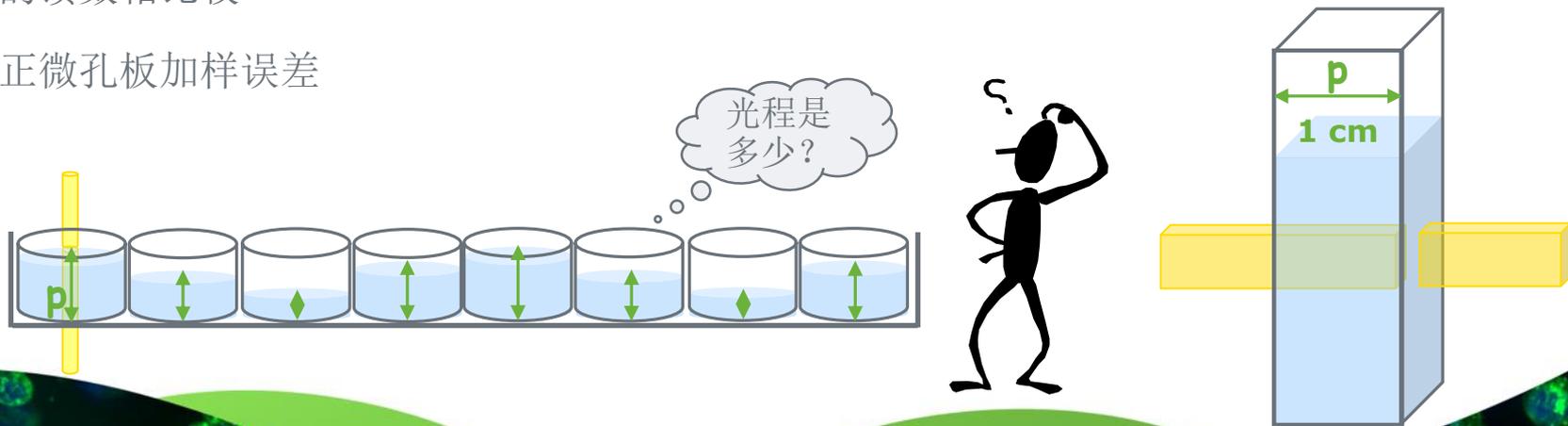
I_0 入射光强度 I 透射光强度
 ε 摩尔消光系数 b 光程 c 样品浓度

- 吸光值 (*Absorbance*) 有时也称为光密度值 (*OD*) Optical Density
- 光吸收值 (OD) 与样品浓度成正比



PathCheck 非温度依赖光程校正

- Pathcheck（非温度依赖型光程校正）无需标准品曲线即可检测样品浓度，而且检测过程不会受到温度变化的影响
- 将微孔板中测得的吸光值数据转化为标准1cm比色杯的读数，使得微孔板的读数可与比色杯的读数相比较
- 校正微孔板加样误差

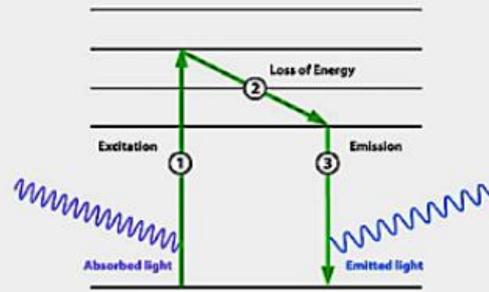


荧光检测

Fluorescence

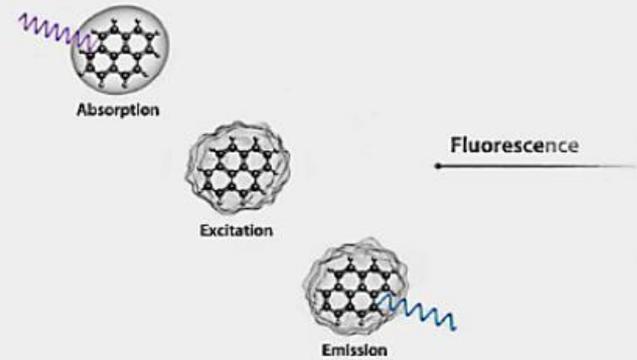
A

Summary



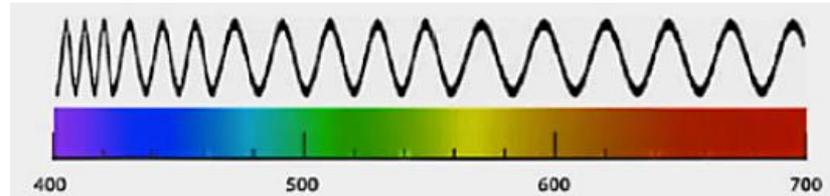
B

Definition of Fluorescence



- 1
- 2
- 3

激发荧光团
能量损耗
荧光发射光信号



有机小分子染料

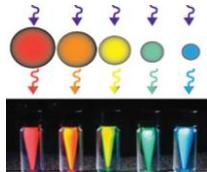


多色

- 紫外到红外
- 斯托克位移小
- 应用多样

01-荧光标记
 抗体标记 FITC/罗丹明
 核酸标记 DAPI/PI
 02-细胞功能检测
 细胞活性 Calcein AM/EthDIII
 细胞周期 Dyecycle
 细胞增殖 CFSE
 细胞凋亡 JC-1

纳米荧光探针

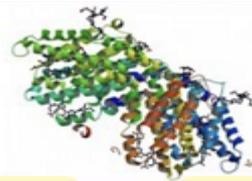


高亮度

- 荧光稳定性好
- 发射光谱狭窄
- 多色分析

01-生物偶联剂
 02-细胞追踪
 03-体内成像
 ▪ Invitrogen Qdot probes
 ▪ Invitrogen eVolve probes

荧光蛋白

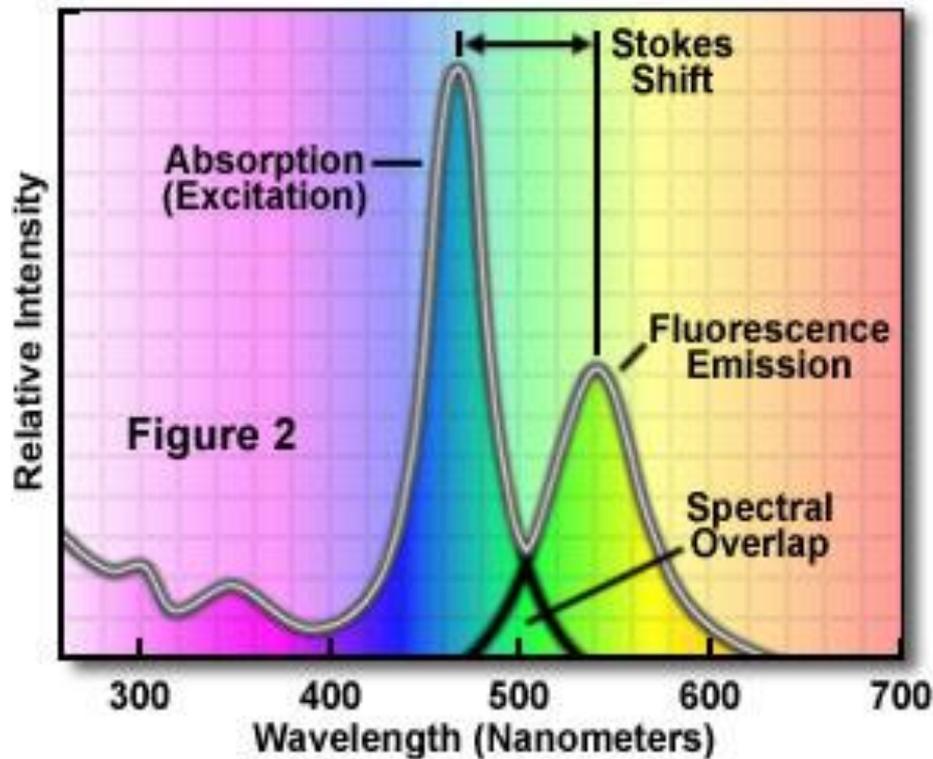


明亮

- 来自水生生物
- 蓝色到近红外
- 种类多样

01-蛋白表达
 02-细胞标记、成像
 03-抗体荧光标记
 04-分子间相互作用
 ▪ 绿色荧光蛋白GFP
 ▪ 藻红蛋白PE
 ▪ 藻蓝蛋白APC
 ▪ FRET对: CFP-YFP

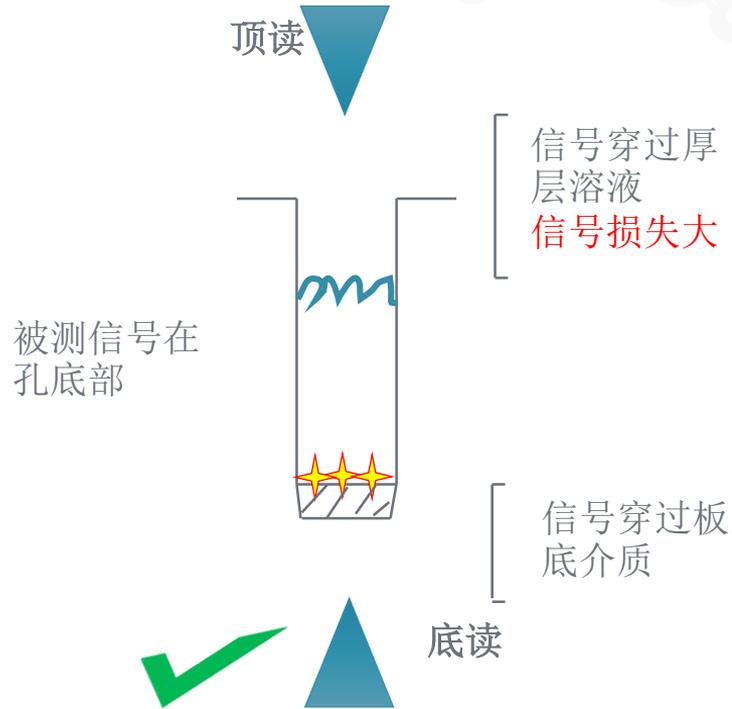
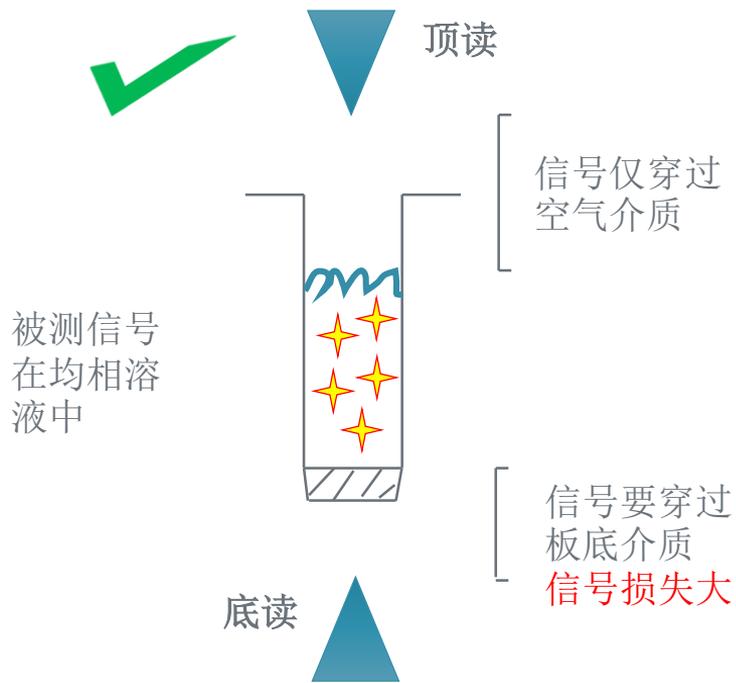
Excitation and Emission Spectral Profiles



- ✓ 减小激发和发射光谱叠加
- ✓ 左移激发波长进行激发
- ✓ 右移发射波长进行检测

斯托克位移
(Stokes Shift)

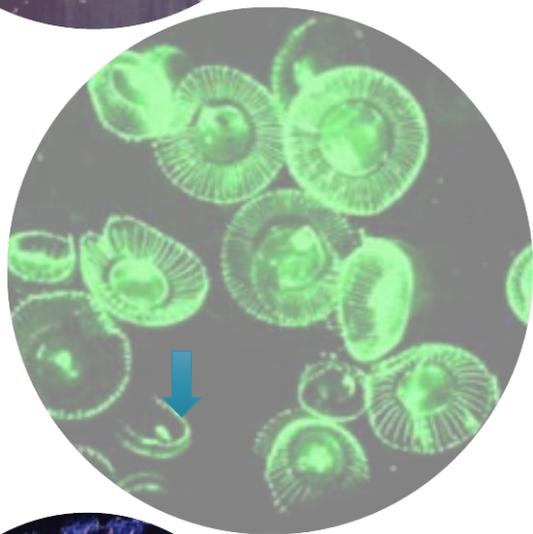
如何选择顶读和底读？



化学发光检测

Luminescence

- 化学发光是通过化学反应或生物化学反应发出的可见光
- 与荧光相比，化学发光**不需要激发光**，因而具有更低的背景
- 化学发光的灵敏度比荧光高2-3个数量级



Firefly



Sea pansy



Jellyfish



Metridia

luciferin

luciferase



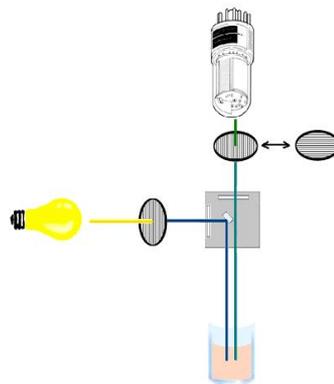
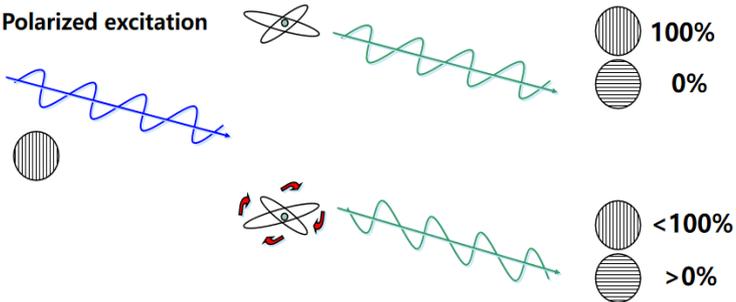
- Enzyme
- Triggering reagent

荧光偏振检测

Fluorescence Polarization

- ❑ 1926年Perrin首次在研究论文中描述他所观察到的荧光偏振现象，20世纪80年代随着荧光探针和荧光偏振仪器的商业化，荧光偏振开始在生物分析领域扮演越来越重要的角色。
- ❑ 荧光分子受平面偏振光激发
- ❑ 如果分子在受激发时期（对于荧光素约持续4ns）保持静止，发射光将位于同样的偏振平面。
- ❑ 如果分子在受激发时期，分子旋转或翻转偏离这一平面，发射光将位于与激发光不同的偏振面。这一现象称为荧光去偏振。

Polarized excitation



荧光偏振：小分子和大分子复合物偏振性

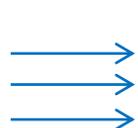
LABEL 

LIGAND 

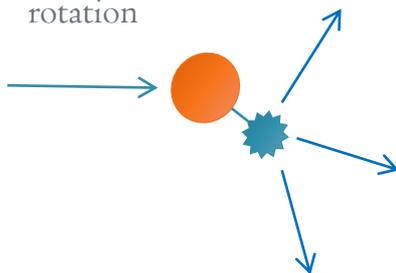
RECEPTOR 

小分子
示踪剂

Polarized
Excitation
Light



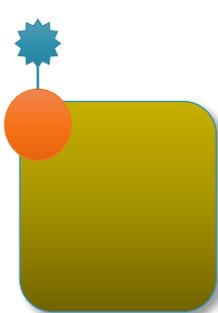
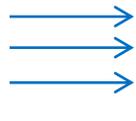
Rapid
rotation



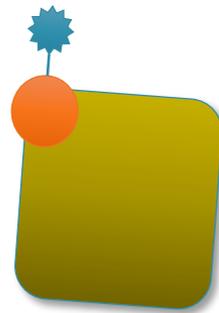
Depolarized
Emission
Light

生物
大分子

Polarized
Excitation
Light



Slower
rotation



Polarized
Emission
Light

荧光偏振（Fluorescence Polarization —FP）

通常用水平方向的偏振光激发荧光分子，然后测量发射偏振光在水平和竖直方向的荧光强度

$$mP = 1000 * \frac{(\text{parallel} - (G * \text{perpendicular}))}{(\text{parallel} + (G * \text{perpendicular}))}$$

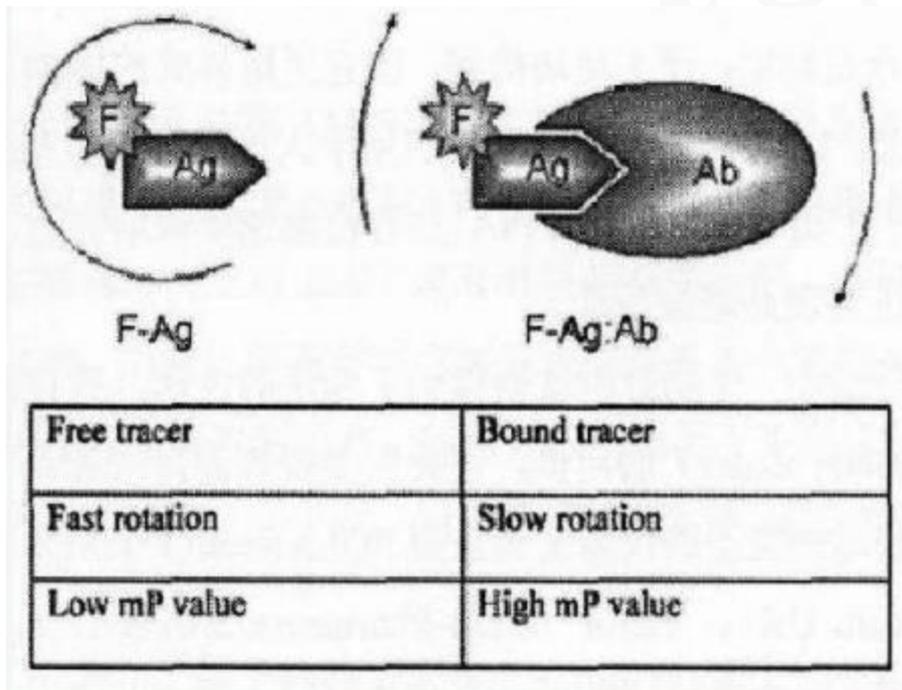
早期的荧光偏振研究均已P值表示，目前仍用于临床化学和药物的筛选。1 P = 1000 mP

$$G \text{ factor} = (I_{\text{obspara}}/I_{\text{obsperp}})(I - P_{\text{true}})/(I + P_{\text{true}})$$

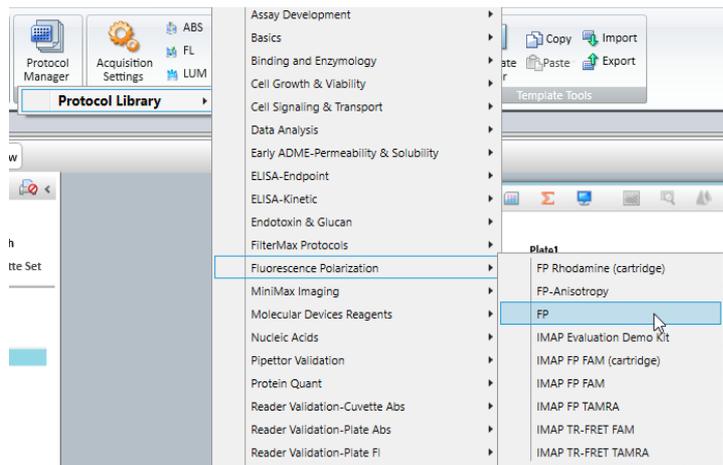
G factor是检测通路的矫正因子，在光学通路里，尤其是带有反射组件，通过不同偏振光的效率不同。G factor通常的范围是0.8-1.2

荧光偏振（Fluorescence Polarization —FP）

- ◆ 分子完全不动即完全偏振时，FP值 $P_0 = 1000 \text{ mP}$ ，是理论的最大值。
- ◆ 以抗原抗体结合的检测为例，如果待测样本中竞争抗原的含量很少（低于检测限），荧光标记的抗原与抗体结合，FP值较高（一般在 $150\text{-}300\text{mP}$ ）
- ◆ 而待测样本中竞争抗原的浓度增加时，荧光标记抗原以游离的形式存在于样本中，FP值便会下降，一般在 $30\text{-}60\text{mP}$ 即为完全抑制

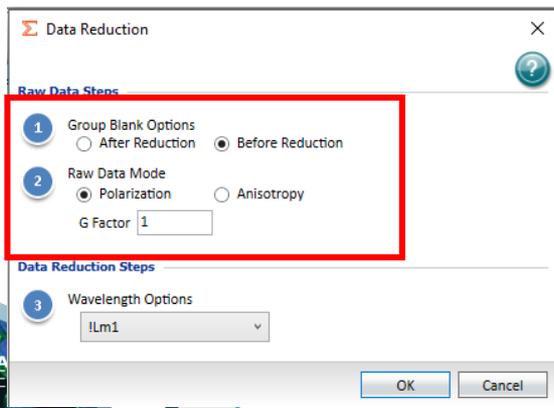


荧光偏振 (Fluorescence Polarization —FP)



ation	mP	AvgmP	SDmP	mPOutliers	Parallel	Perpendicular	Total Intensity	AvgTotInt	SDtotint	TotIntOutliers
1.000										
1.000										
1.000										
1.000										
1.000										
1.000										
1.000										
1.000										
1.000										
1.000										

Group Blank =
Outlier-Determining SD = 2



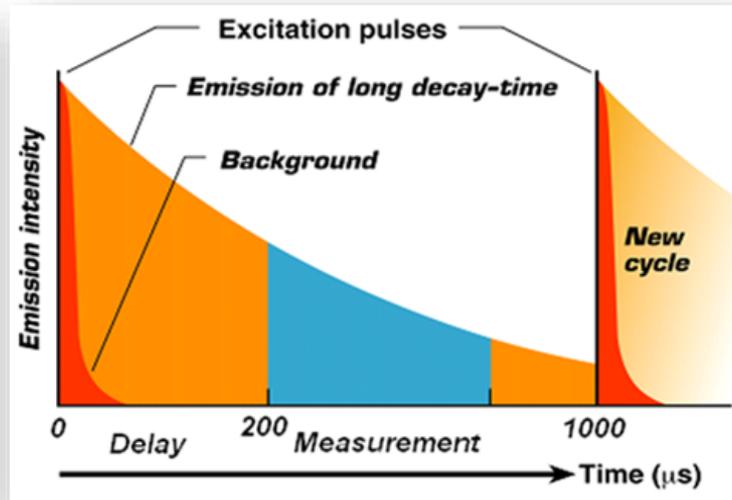
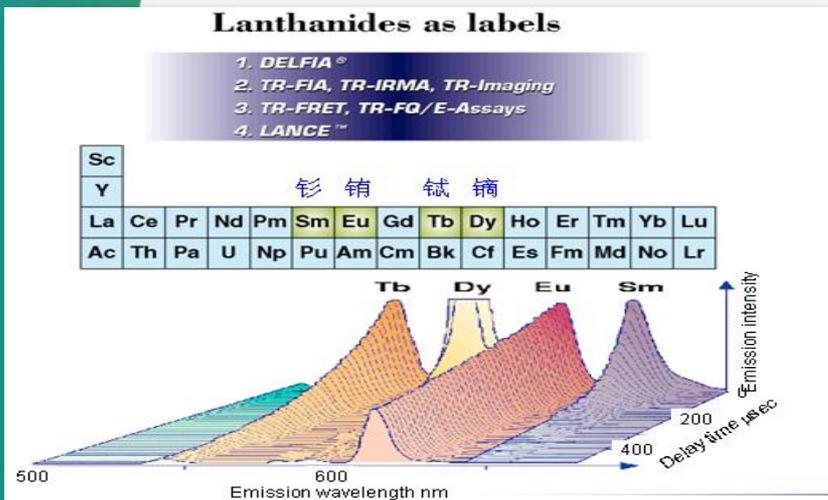
计算的值有mP, AvgmP, SDmP, mPOutliers, Para, Perp, total intensity, average Total intensity, SD total intensity, total intensity Outliers



时间分辨荧光检测

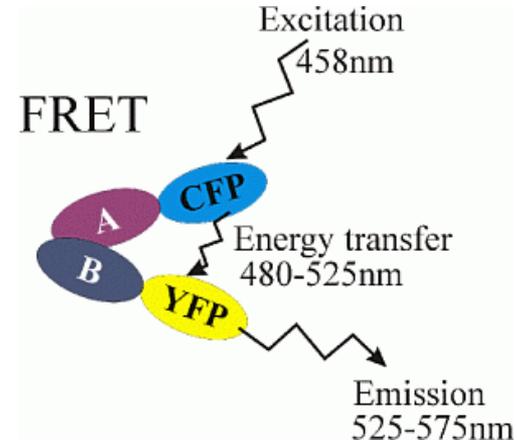
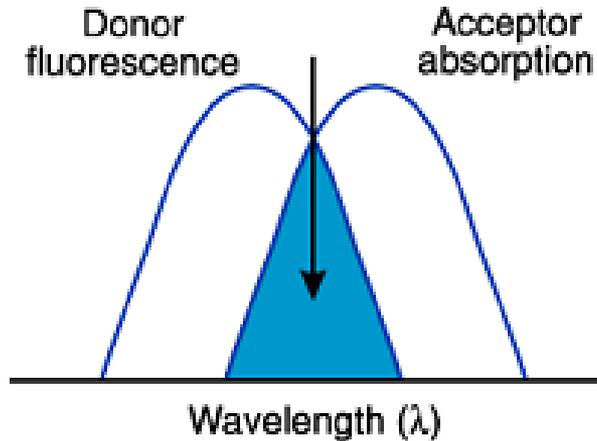
Time-resolved Fluorescence

- 使用**镧系元素**标记，有着长荧光寿命周期 (μsec 可至 1ms)
- 当被闪烁氙灯激发后, 其发射光维持的时间要比普通 荧光素长很多 (ns)
- 传统荧光染料最大弊端: 荧光寿命短, 易受到样品自发荧光干扰



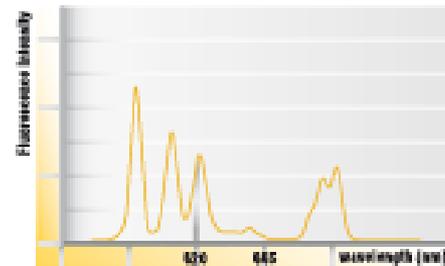
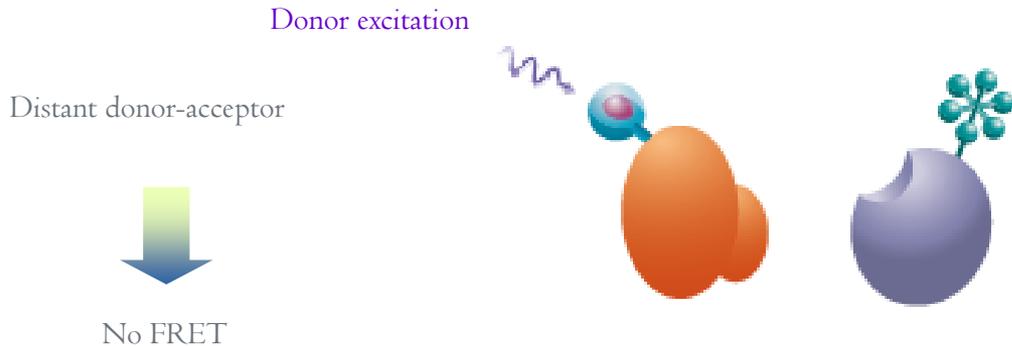
多标记检测(FRET)

- 荧光共振能量转移 (FRET) 是两个荧光探针分子之间在特定的条件下产生一种非辐射的能量转移现象
- ✓ 供体分子发射光谱与受体分子的激发光谱有重叠
- ✓ 二者空间距离不超过10nm
- ✓ 二者的偶极矩空间取向不能互相垂直

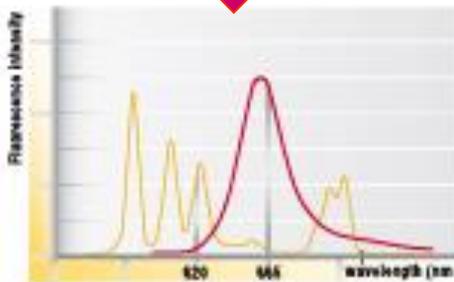
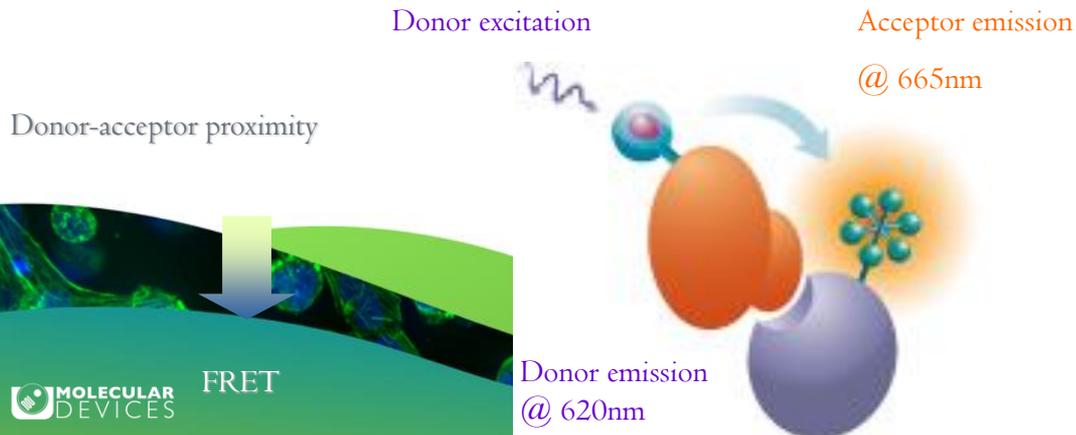


多标记检测(TR-FRET)

- TR-FRET 结合了 TRF 和 FRET 的特点
- 供体分子(Donor)镧系元素(Eu/Tb)
- 低背景(TRF)+均相检测(FRET)

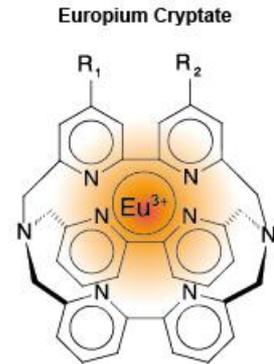
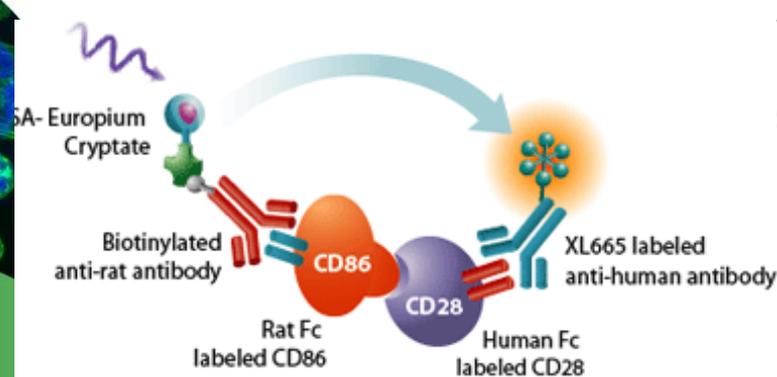


Acceptor specific emission



多标记检测(HTRF)

- HTRF 即均相时间分辨荧光(Homogeneous Time-Resolved Fluorescence)
- HTRF是Cisbio公司的注册商标，它是TR-FRET的改良技术
- 供体TRF染料不是普通镧系元素的螯合物(环状结构配合物)，而是镶嵌铕的一个穴状化合物，受体染料是XL665，其荧光寿命短，不易与Eu发生干扰
- Cisbio会提供HTRF认证给性能符合要求的酶标仪（如MD 公司的M5e、Flexstation3、Paradigm、i3/i3x HTRF卡盒、iD5）



多标记检测(HTRF)

供体染料分子Eu³⁺镶嵌在穴状笼子中

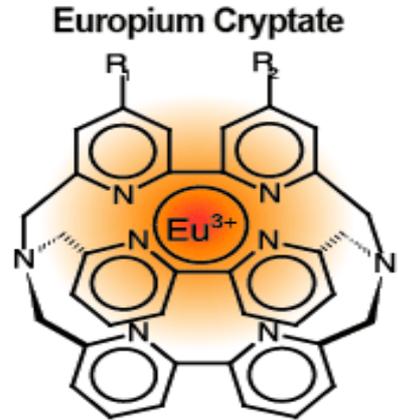
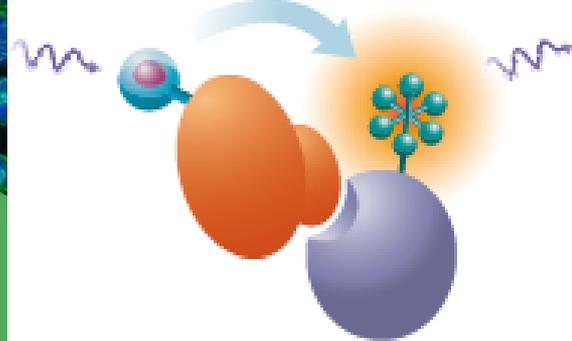
穴状笼子结构的稳定性:

- 背景信号低, 很少出现假阴性和假阳性结果
- 检测时间灵活: 信号检测可达7天
- 可进行动力学研究 (穴状化合物无光漂白)
- 可耐受低pH值、金属离子、DMSO、EDTA等, 增强了检测稳定性
- 专利的比值测量能矫正淬灭和样品带来的干扰

Excitation

FRET

Emission



HTRF的应用领域

1

G蛋白偶联受体研究：受体第二信使检测，受体配体结合胞内信号分子检测

2

激酶活性检测：胞内/胞外激酶活性检测

3

生物标志物检测：胞内/胞外激酶活性检测

4

免疫过程分析：CD16，CD32，CD64结合检测

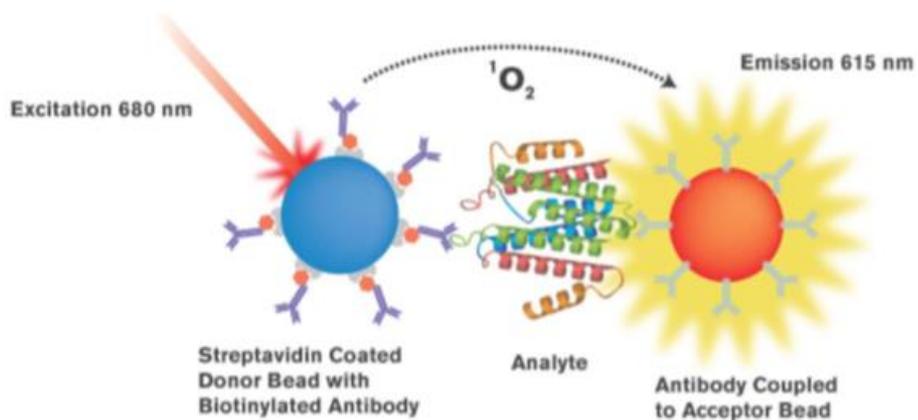
5

相互作用分析：蛋白-蛋白，蛋白-多肽，蛋白-DNA，蛋白-RNA

Alpha(AlphaScreen, AlphaLisa)

AlphaScreen/AlphaLISA实验是以磁珠为背景的亲合实验，基于氧分子的输送。

蓝色供体珠包含光敏剂苯二甲蓝，680nm激发光照射下，它周围环境中的氧分子转化成为一种高能活跃的氧状态-单态氧。



- 供体微珠每秒能够产生60000个左右的单态氧分子，4 μ s的半衰期内，单态氧分子可在溶液中扩散高达200nm的距离。在此范围内若存在受体微珠，单态氧就会触发受体微珠的二甲基噻吩衍生物，继而激发一系列的化学反应，并在520-620nm产生光信号，达到检测目的。

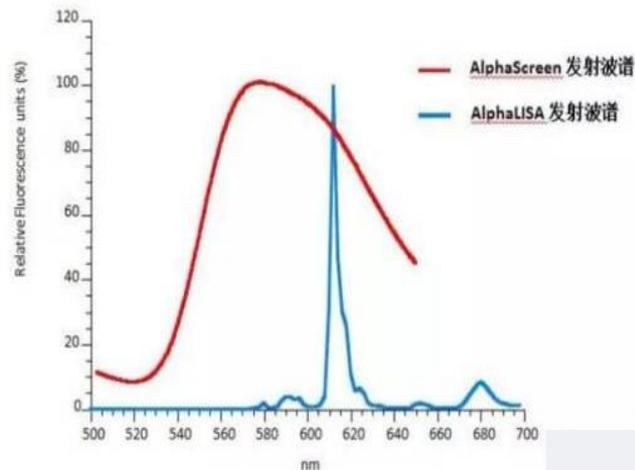
AlphaScreen和AlphaLISA的区别



红荧烯发射波长: 540-680 nm
检测波长: 520-620 nm



Eu 发射波长: 605-625 nm
检测波长: 607-623 nm



普通的受体微珠 (AlphaScreen) Eu标记的受体微珠 (AlphaLISA)

Alphascreen受体微珠: 二甲基噻吩、葱、红荧烯 (最终发光染料)

AlphaLISA受体微珠: 二甲基噻吩、Eu螯合物

Alpha技术的特点

均相体系	Mix and measure, 不需要分离和清洗
非放射性	不需要与放射性有关的特殊试剂的处理
灵敏（低背景）	680nm为较大的激发光波长, 基本没有自发光成分干扰到整个实验, 读取信号波长低于激发波长, 避免了由激发光干扰产生的背景信号
灵敏（放大信号）	供体珠上高浓度的感光材料和受体珠上高密度的二甲基噻吩衍生物和荧光素, 每秒释放60000个单体氧, 产生非常高的信号放大, 可检测到pmol级别的化合物活性
亲和性检测的范围广泛	可以检测纳米-微米级物质的亲和性
检测距离	磁珠距离最远可达200nm, 这个距离可以检测简单甚至是复杂的生物学互作
自动化	磁珠非常的小(直径250nm), 不会堵塞枪头, 所以适合自动进样, 是HTS的理想方法
微型化体积	AlphaScreen适用于96/384/1536孔板, 且不需要改变试剂的浓度, 也不会影响灵敏度。实验体系可以很小。PE提供的封板膜可以最大限度的减少蒸发, 且在检测时不需要取下来
灵活的实验设计	可以检测多种生物互作型实验（蛋白互作, 激酶, 第二信使, 等）



Alpha检测的注意事项

➤ 对光敏感

- 链霉亲和素包被的供体微珠对光敏感，受体微珠对光不敏感。
- 强光直射可能会激发供体微珠，释放出单分子氧并与供体微珠发生反应降低其激发效率。
- 供体微珠必须在低于100 Lux(相当于阴天时的亮度，办公室灯光为320-500 Lux)光照强度下保存，或者光源处采用绿色滤片，孵育和检测时需避光。
- 不适合反复检测或动力学检测

➤ 对温度敏感

- 最佳的检测温度为23 °C，可接受的温度范围是22-25 °C
- 温度每变化1 °C，信号会变化8%
- 如果温度升高到25 °C，信号会减少16%
- 如果温度下降到20 °C，信号则降低24%

- 试剂、孔板和检测时的环境温度需要很好的达到平衡，且温度不可过高或过低以及较大的温度波动



6

常见应用

Basic Application



- 分子生物学

- 核酸/蛋白定量
- 报告基因检测

- 药代动力学研究

- 细胞增殖
- 细胞活性/毒性
- 细胞凋亡

- 细胞信号转导
 - 激酶研究
 - NFkB
 - Ca^{2+}
 - cAMP
- 微生物学
 - 细菌增殖
 - 内毒素
 - 支原体



分子生物学研究

— 核酸/蛋白定量，报告基因检测

I、核酸定量于微孔板

DNA或RNA的浓度，当光程为1cm的时候， $A_{260}=1.0$

- 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 双链DNA(dsDNA)
- 33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 单链DNA(ssDNA)
- 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNA
- 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 寡核苷酸(Oligos)

DNA或RNA的纯度

- DNA纯品: $A_{260}/A_{280} = 1.8$
- RNA纯品: $A_{260}/A_{280} = 2.0$
- DNA/RNA : $A_{260}/A_{230}=2.0\sim 2.5$

A_{260}/A_{280} : 如果比值低于1.8，表示存在蛋白质或者酚类物质污染，高于2.0，表示存在RNA污染
 A_{260}/A_{230} : 如果比值小于2.0,表明样品被多肽、盐类或有机溶剂污染，需要纯化样品

Quartz Microplates
Quality for highest demands



离子强度对核酸紫外吸收值的影响

- 溶液中离子浓度增加会降低吸光值，将DNA直接溶解在水中其吸光值较将DNA溶解在盐离子溶液中高出30%，摩尔消光系数会发生改变。

- 一般计算DNA浓度：

$OD_{260} = I$ 表示 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 双链DNA(dsDNA)

- 实际当DNA在不同溶液成分中溶解时，浓度系数改变：

- DNA in TE + Saline = 50
- DNA in TE buffer = 45
- DNA in water = 38

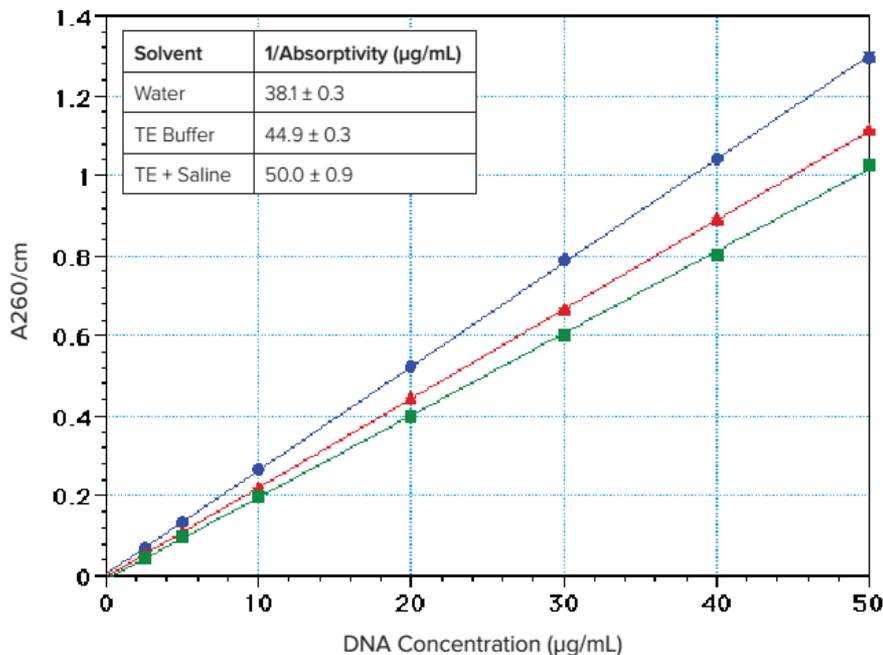


Figure 2. Effect of ionic strength on DNA absorption at 260 nm. The DNA (Sigma Type I "Highly polymerized", Cat. No. 1501) was dissolved in deionized water (blue circles) or TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4) (red triangles) or TES (TE buffer + 0.9% NaCl) (green squares). Inset: 1/absorptivity values; Average of 7 concentrations (2.5–50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 4 replicates each.

DNA/RNA/Protein 高通量定量检测

2、核酸定量于超微量微孔板

使用超微量检测板,其光程固定, 软件回算

- SBS 规格适配器+ 2 层玻片设计
 - 24 或 64 个样品/次
 - 2uL 或 4uL 上样体积
- 检测灵敏度
 - 2ng/uL (dsDNA)
- 清洗简便
- 玻片可替换式设计, 避免交叉污染



轻松快速搞定超微量检测



Protocol Manager Acquisition Settings ABS FL LUM

Protocol Library

Assay Development

Basics

Binding and Enzymology

Cell Growth & Viability

Cell Signaling & Transport

Data Analysis

Early ADME-Permeability & Solubility

ELISA-Endpoint

ELISA-Kinetic

Endotoxin & Glucan

FilterMax Protocols

Fluorescence Polarization

MiniMax Imaging

Molecular Devices Reagents

Nucleic Acids

Pipettor Validation

Protein Quant

Reader Validation-Cuvette Abs

Reader Validation-Plate Abs

Reader Validation-Plate FI

Reader Validation-Plate Lum

Reader Validation-Plate Multi-Mode

Reporter Assays

SpectraCuvette Holder

SpectraDrop Micro-Volume Microplate

TR-FRET

Default

SpectraMax ABSPlusDefault

SpectraMax ABSDefault

SpectraMax iD3Default

SpectraMax iD5Default

Copy Import

Paste Export

Template Tools

Plate1

	6	7	8	9	10	11	12

SpectraDrop Abs DNA Quant (cartridge)

SpectraDrop Abs DNA Quant

SpectraDrop Abs Protein Quant with Strnds

SpectraDrop Abs Protein Quant

SpectraDrop Abs RNA Quant (cartridge)

SpectraDrop Abs RNA Quant

SpectraDrop Fluor DNA Quant (cartridge)

SpectraDrop Fluor DNA Quant (FilterMax)

SpectraDrop Fluor DNA Quant

Document Comparison Workflow

Navigation Tree

- New Experiment New Plate
- New Note New Graph
- Delete Selection New Cuvette Set
- READ FIRST
 - Introduction
- 24-well
 - Quantitation
 - Spectrum
 - 1mm_4uL
 - 0.5mm_2uL
- 64-well
 - Quantitation
 - Spectrum
 - 1mm_4uL
 - 0.5mm_2uL

蛋白质定量——光吸收法

方法	灵敏度	时间	原理	应用	检测波长
紫外光吸收法	较为灵敏 50-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	最快速 5~10min	蛋白质中的酪氨酸和色氨酸残基在280nm处有光吸收	纯化后的蛋白定量	280nm
改良的Lowry法	灵敏度高 1-1500 $\mu\text{g}/\text{ml}$	慢速 40~60min	双缩脲反应；磷钼酸-磷钨酸试剂被酪氨酸和苯丙氨酸还原	TCA沉淀后的蛋白定量	750nm
考马斯亮蓝法	灵敏度高 1-25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或 100-1,500 $\mu\text{g}/\text{ml}$	快速 5~15min	考马斯亮蓝染料与蛋白质结合时，其最大吸收峰由465nm变为595nm， 改良法降低了不同蛋白质与染料结合后的颜色差异	蛋白质快速定量 (可耐受大多数的还原剂如BME、DTT等)	595nm
改良的考马斯亮蓝法	灵敏度高 1-25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或 100-1,500 $\mu\text{g}/\text{ml}$				
BCA法	灵敏度高 5-250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或 20-2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	中速 30~50min	在碱性溶液中,蛋白质将二价铜(CU ²⁺)还原成一价铜(CU ⁺)后者与测定试剂中BCA(金鸡宁)生成一个在562nm处具有最大光吸收的紫色复合物	蛋白质定量，尤其是膜蛋白定量(可耐受大多数的变性剂如SDS, TritonX-100等；不能耐受还原剂如DTT, BME, 葡萄糖, 抗坏血酸等)	562nm
微量蛋白BCA法	灵敏度最高 0.5-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$				
660nm蛋白定量分析试剂	灵敏度高 25-2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	快速 5~15min	在酸性条件下660nm蛋白定量分析试剂(专利的染料金属复合物)与蛋白结合，使染料的最大吸收值发生偏移	蛋白质快速定量(可耐受高浓度的变性剂，还原剂和其他通用试剂)	660nm

Protocol Manager Acquisition Settings

ABS
FL
LUM

Protocol Library

Protocol Set

Protocol Set

- Assay Development
- Basics
- Binding and Enzymology
- Cell Growth & Viability
- Cell Signaling & Transport
- Data Analysis
- Early ADME-Permeability & Solubility
- ELISA-Endpoint
- ELISA-Kinetic
- Endotoxin & Glucan
- FilterMax Protocols
- Fluorescence Polarization
- MiniMax Imaging
- Molecular Devices Reagents
- Nucleic Acids
- Pipettor Validation
- Protein Quant**
- Reader Validation-Cuvette Abs
- Reader Validation-Plate Abs
- Reader Validation-Plate FI
- Reader Validation-Plate Lum
- Reader Validation-Plate Multi-Mode
- Reporter Assays
- SpectraCuvette Holder
- SpectraDrop Micro-Volume Microplate
- TR-FRET
- Default
- SpectraMax ABSPlusDefault
- SpectraMax ABSDefault
- SpectraMax iD3Default
- SpectraMax iD5Default

Copy Import
Paste Export

Template Tools

Σ [Icon] [Icon] [Icon]

Plate1

	6	7	8	9	10	11	12

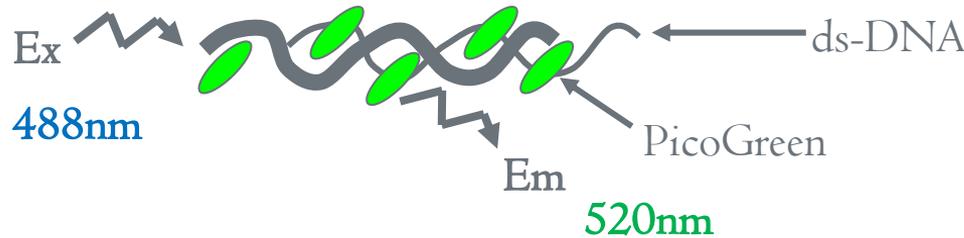
- A280-CuvetteRef
- A280-WaterConstant
- BCA
- Bradford
- DC Protein Assay
- Lowry
- NanoOrange
- SpectraDrop Abs Protein Quant with Stnds
- SpectraDrop Abs Protein Quant



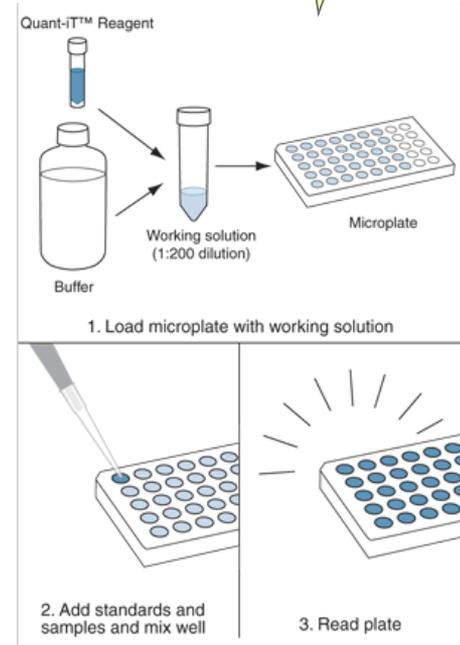
核酸定量——荧光法

✓ Quant-iT™ PicoGreen® (dsDNA)

- 原理: 超灵敏核酸结合荧光染料结合 dsDNA
- 相比 OD₂₆₀: 具有更高灵敏度, 比 OD₂₆₀ 灵敏 5000 倍, 高度特异性, 不会受到 ssDNA、RNA、蛋白影响
 - 检测范围: 50pg/mL 至 2000 ng/mL
 - 动态检测范围: ≥4logs



✓ RiboGreen(RNA) 和 OliGreen(ssDNA)



Operations Workflow

Protocol Manager Acquisition Settings ABS FL LUM

Protocol Library

te Set

- Assay Development
- Basics
- Binding and Enzymology
- Cell Growth & Viability
- Cell Signaling & Transport
- Data Analysis
- Early ADME-Permeability & Solubility
- ELISA-Endpoint
- ELISA-Kinetic
- Endotoxin & Glucan
- FilterMax Protocols
- Fluorescence Polarization
- MiniMax Imaging
- Molecular Devices Reagents
- Nucleic Acids**
- Pipettor Validation
- Protein Quant
- Reader Validation-Cuvette Abs
- Reader Validation-Plate Abs
- Reader Validation-Plate FI
- Reader Validation-Plate Lum
- Reader Validation-Plate Multi-Mode
- Reporter Assays
- SpectraCuvette Holder
- SpectraDrop Micro-Volume Microplate
- TR-FRET
- Default
- SpectraMax ABSPlusDefault
- SpectraMax ABSDefault
- SpectraMax iD3Default
- SpectraMax iD5Default

Copy Import
Paste Export

Template Tools

Plate1

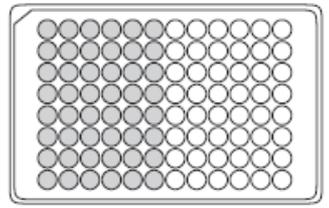
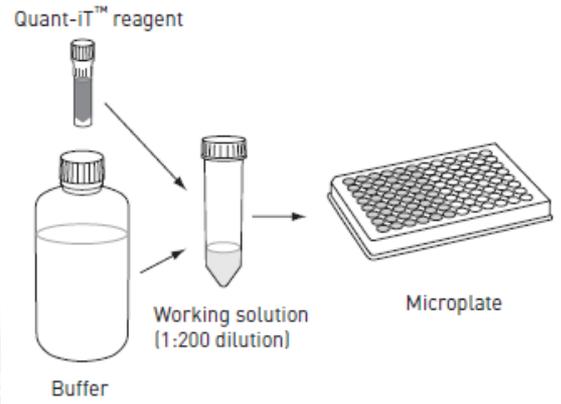
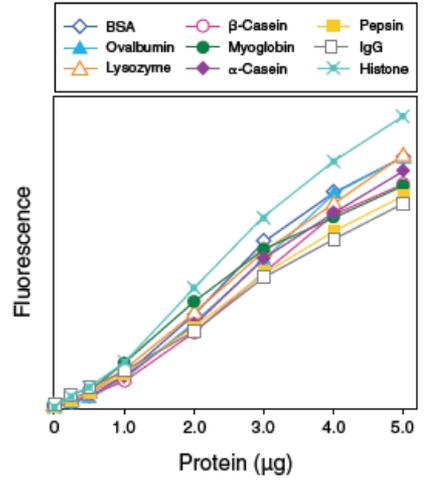
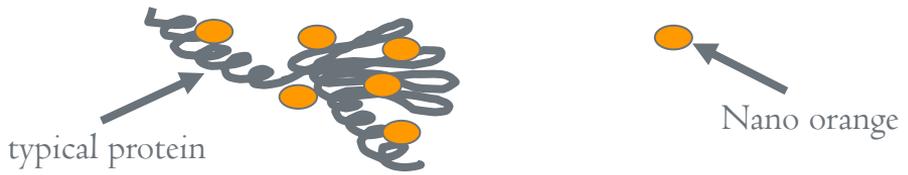
6	7	8	9	10	11	12

- ATP Assay
- DNA RNA & PathCheck
- FilterMax F5 DNA RNA & PathCheck
- OliGreen Fluorescence
- PicoGreen Fluorescence**
- RiboGreen Fluorescence
- SpectraCuvette Abs DNA Quant
- SpectraDrop Abs DNA Quant (cartridge)
- SpectraDrop Abs DNA Quant
- SpectraDrop Abs RNA Quant (cartridge)
- SpectraDrop Abs RNA Quant
- SpectraDrop Fluor DNA Quant (cartridge)
- SpectraDrop Fluor DNA Quant (FilterMax)
- SpectraDrop Fluor DNA Quant
- SpectraMax Quant AccuBlue HiRange dsDNA
- SpectraMax Quant AccuBlue Pico dsDNA
- SpectraMax Quant AccuClear Nano dsDNA
- TaqMan SNP

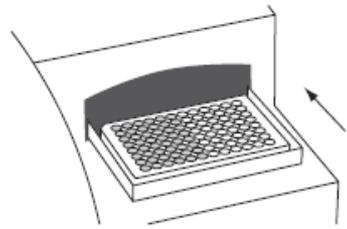


蛋白定量——荧光法

- ✓ Quant-iT Protein Assay Kits
- 检测范围: 12.5 μg/mL to 5 mg/mL 使用荧光酶标仪
- 不同种类蛋白检测差异性小
- 信号可稳定3h



Add Quant-iT™ standards (10 μL) and unknown samples (1-20 μL)



Protocol Manager Acquisition Settings

ABS
FL
LUM

Protocol Library



Protocol Set

- Assay Development
- Basics
- Binding and Enzymology
- Cell Growth & Viability
- Cell Signaling & Transport
- Data Analysis
- Early ADME-Permeability & Solubility
- ELISA-Endpoint
- ELISA-Kinetic
- Endotoxin & Glucan
- FilterMax Protocols
- Fluorescence Polarization
- MiniMax Imaging
- Molecular Devices Reagents
- Nucleic Acids
- Pipettor Validation
- Protein Quant**
- Reader Validation-Cuvette Abs
- Reader Validation-Plate Abs
- Reader Validation-Plate FI
- Reader Validation-Plate Lum
- Reader Validation-Plate Multi-Mode
- Reporter Assays
- SpectraCuvette Holder
- SpectraDrop Micro-Volume Microplate
- TR-FRET
- Default
- SpectraMax ABSPlusDefault
- SpectraMax ABSDefault
- SpectraMax ID3Default
- SpectraMax ID5Default

Copy Import
Paste Export

Template Tools

Σ [Icons]

Plate1

6	7	8	9	10	11	12

- A280-CuvetteRef
- A280-WaterConstant
- BCA
- Bradford
- DC Protein Assay
- Lowry
- NanoOrange**
- SpectraDrop Abs Protein Quant with Stnds
- SpectraDrop Abs Protein Quant



常见报告基因种类和特点

报告基因作为一种检测目的基因的工具

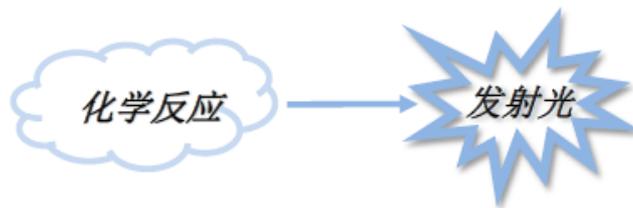
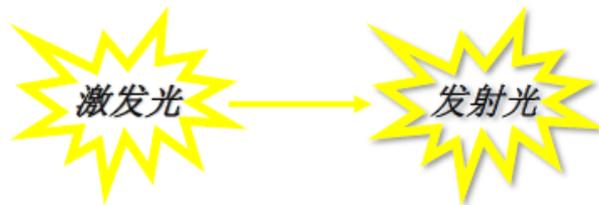
报告基因：检测基因表达水平、研究基因调控原件、研究药物作用等

什么才是理想的报告基因体系？

内源性不表达、检测灵敏度高、线性范围宽、一个样本检测两个报告基因

报告基因	检测方法	优点	缺点
GUS 葡糖醛酸糖苷酶	吸收光/荧光	植物中内源表达低	哺乳动物和E.coli中高内源性表达
β -Gal β -半乳糖苷酶	吸收光	灵敏度高，操作便捷	细菌血清等样本高内源性表达
SEAP 分泌性碱性磷酸酶	吸收光、发光	分泌性，不需要裂解底物	多数肿瘤细胞中较高内源性表达
CAT 氯霉素乙酰基转移酶	同位素	真核细胞中无表达	放射性，灵敏度低
荧光素酶	发光	优越的灵敏度，真核细胞 无内源表达	需要底物
GFP 绿色荧光蛋白	荧光	不需要底物	可能影响蛋白折叠；潜在细胞毒性

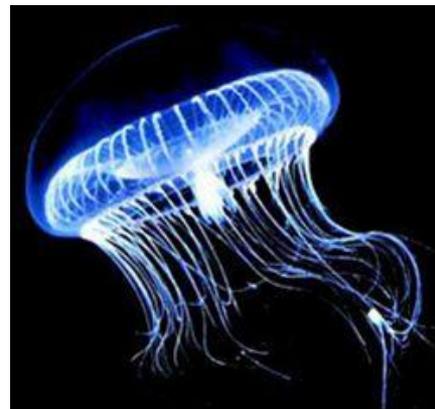
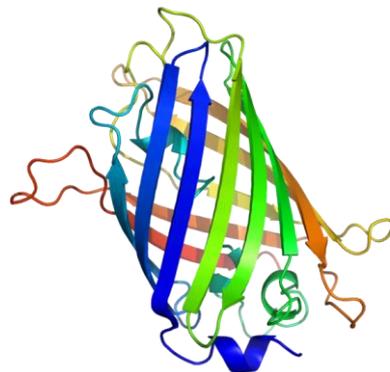
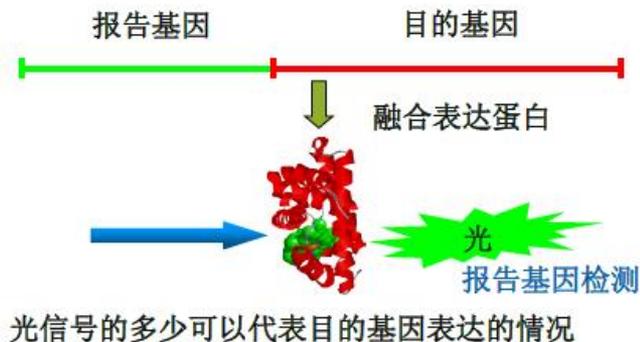
主要两种报告基因系统



Method	Excitation	Filter	Background	Sensitivity	Dynamic Range
Fluorescence	Y	Y	High	++	10^6
Bioluminescence	N	N	Low	++++	10^8

荧光报告基因：GFP

- GFP被广泛地用作报告基因Ex395nm/Em510nm
- GFP报告基因是一种同时编码GFP和靶标序列的基因，把GFP的编码序列和基因表达调节序列相融合形成嵌合基因，或与其它目的基因相融合，在调控序列控制下进行表达，通过检测GFP的荧光强弱来标定目的基因的表达调控。



有各种光谱改变的GFP供选择:

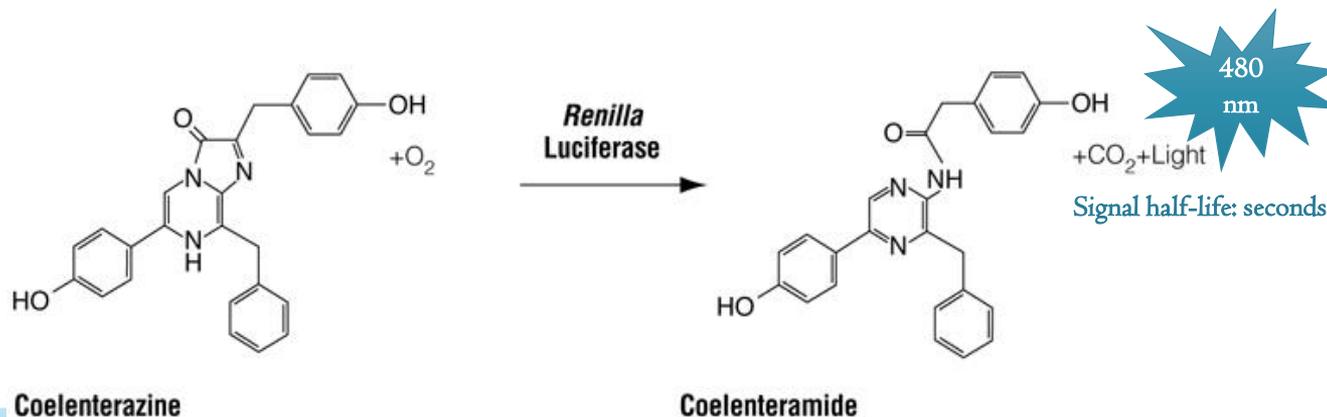
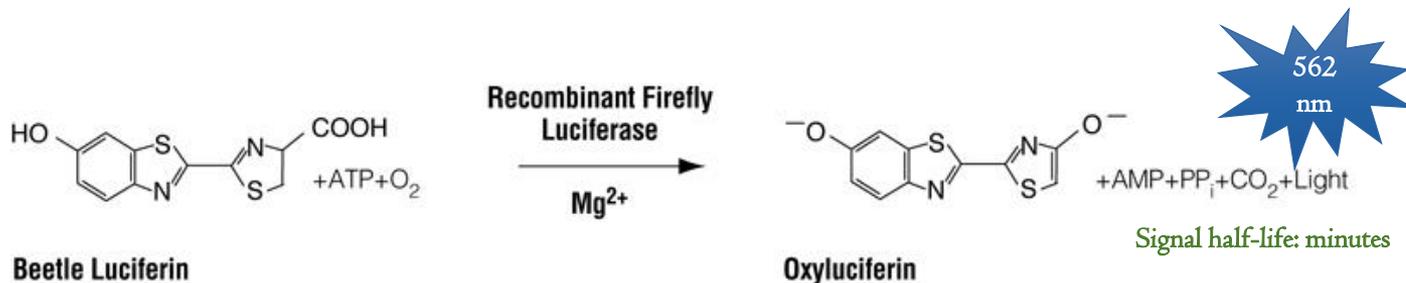
EGFP (red shifted) Ex484nm, Em510nm

ECFP (cyan) Ex439nm, Em476nm

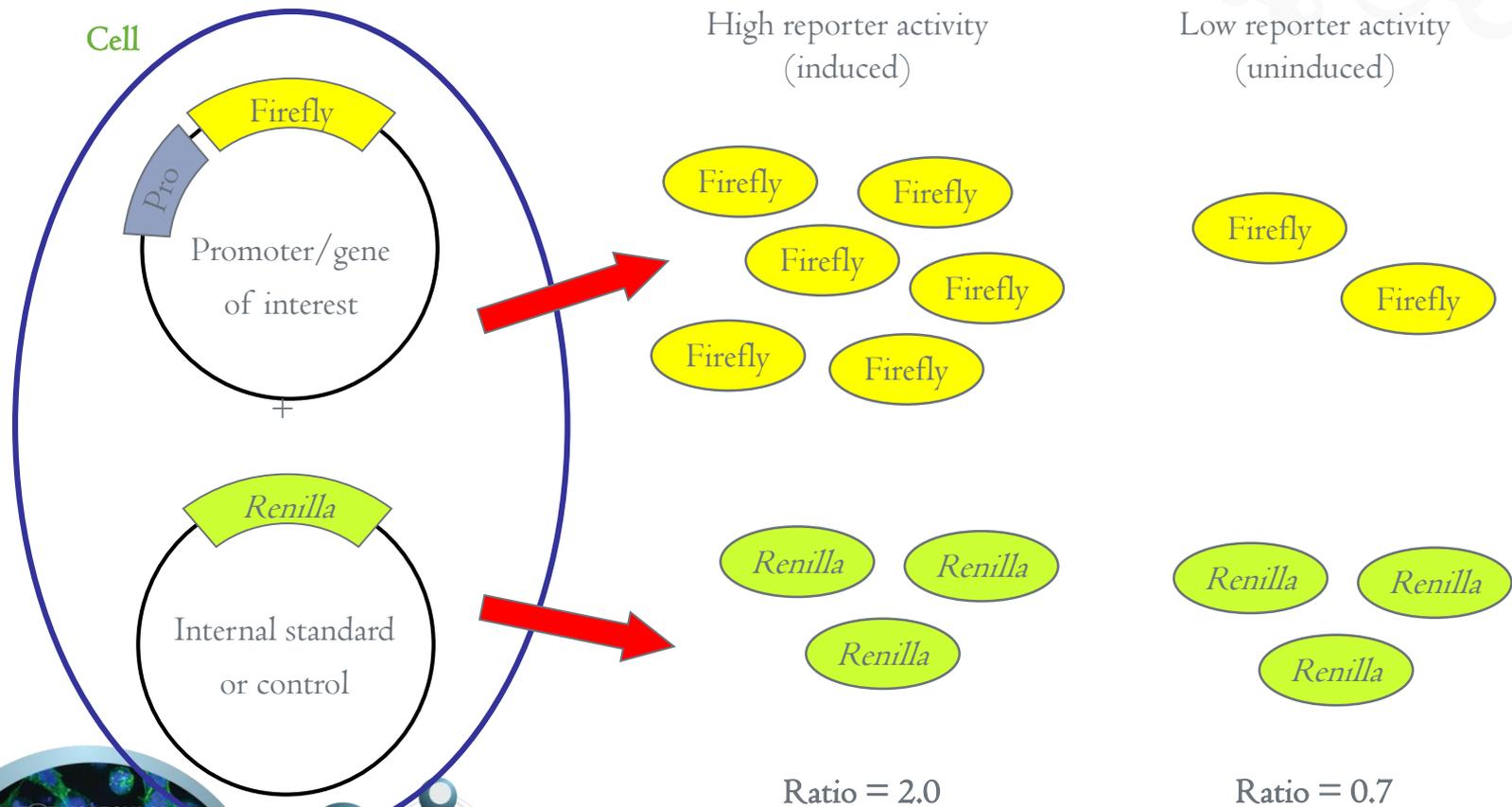
EYFP (yellow) Ex512nm, Em529nm

化学发光报告基因

Firefly and *Renilla* luciferases

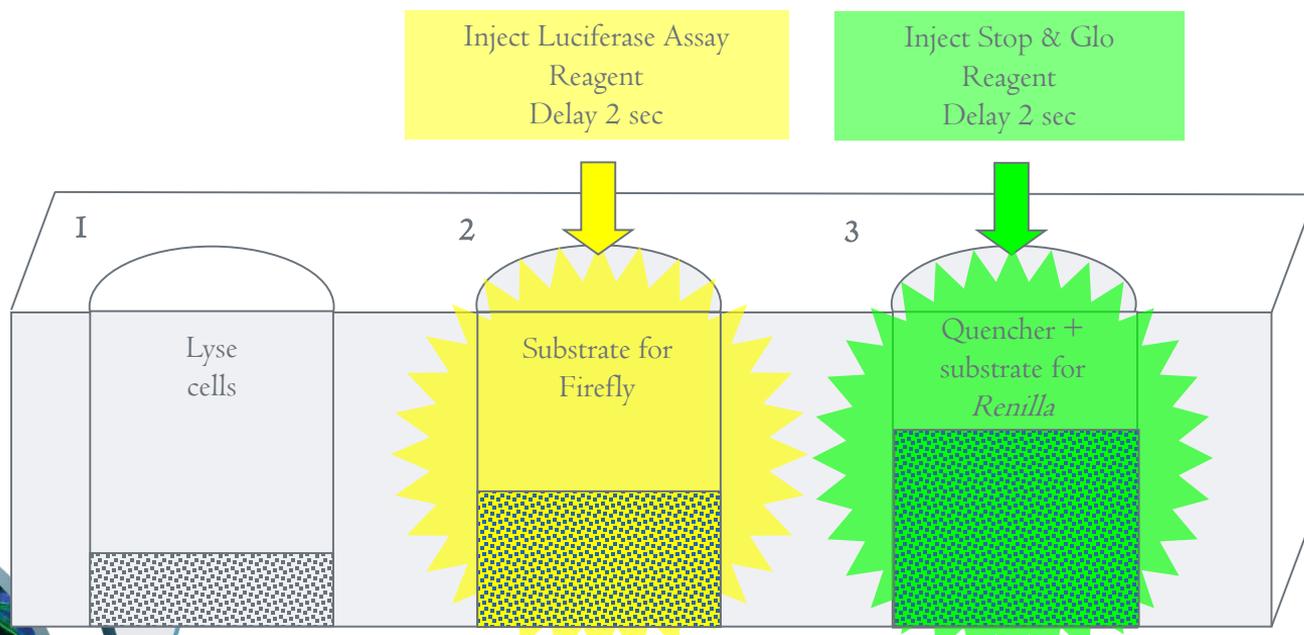


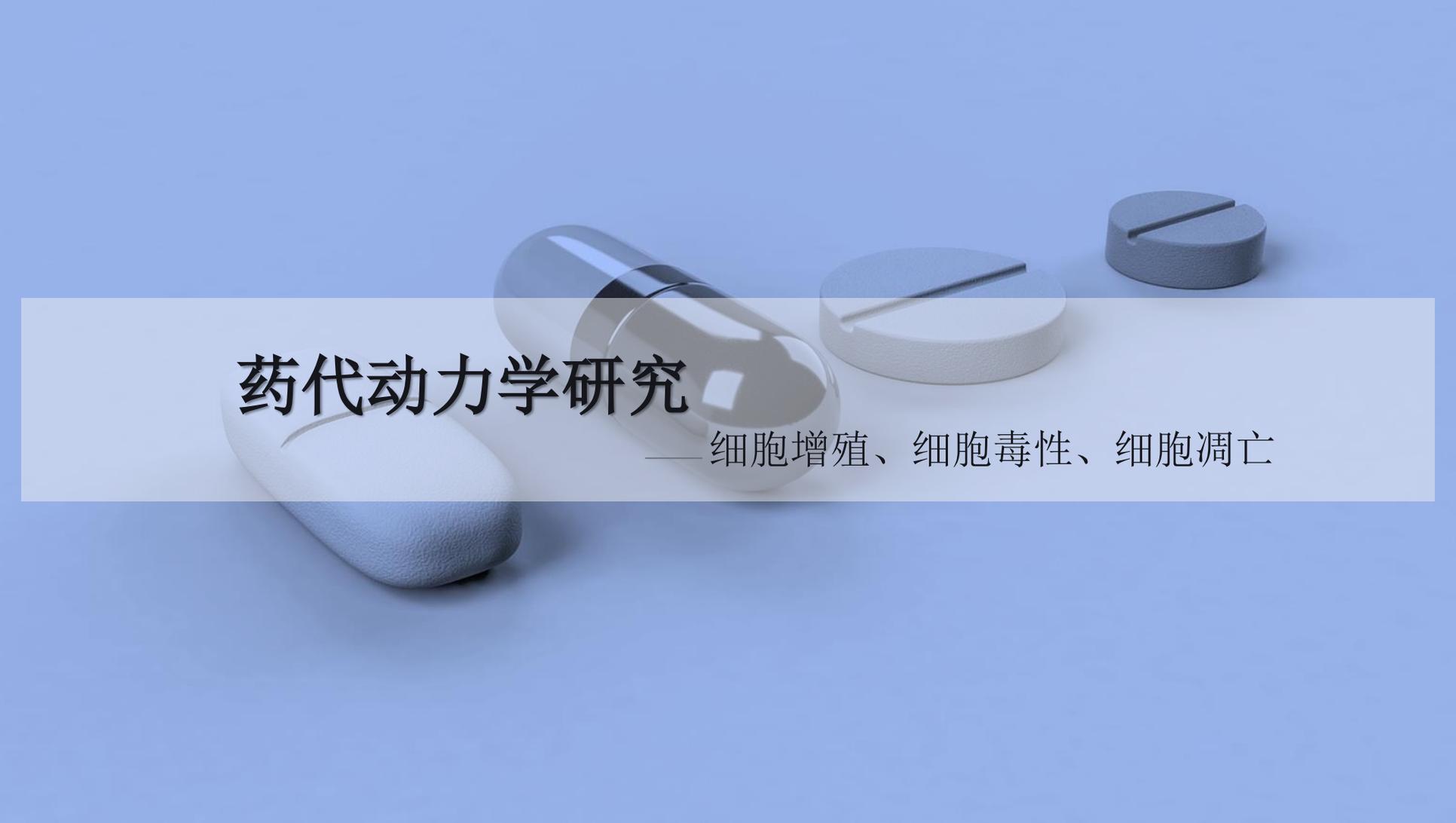
化学发光双报告基因系统



操作流程

- 萤火虫萤光素酶和海肾萤光素酶按一定比例同时转染细胞
- 光信号检测：先检测萤火虫萤光素酶发光信号，再检测海肾萤光素酶光信号
 - 辉光（Glow）：灵敏度比闪光低10倍，但是无需Injectors
 - 闪光（Flash）：灵敏度高，但需要Injectors





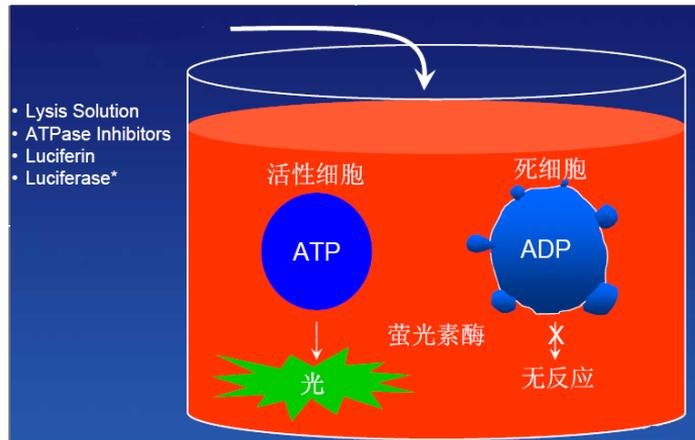
药代动力学研究

——细胞增殖、细胞毒性、细胞凋亡

细胞活性常用检测方法

- ▶ 根据活性细胞中的酶活性（光吸收法）
 - MTT、XTT、WST-1、CCK8的显色反应
- ▶ 根据活性细胞中的ATP含量（化学发光法）
 - ATP含量越高，luciferase作用萤光素反应越强，发光越强
- ▶ 根据活性细胞膜的完整性/通透性（荧光法）
 - 活性细胞的完整细胞膜可以阻挡荧光染料分子的渗透，而死细胞通透性增强 则可进入，例如一些DNA染料即可分别标记活细胞与死细胞
- ▶ 根据细胞形态（显微镜观察法）
 - 细胞计数，无法准确区分死细胞

检测仪器：酶标仪、流式细胞仪、高内涵、
显微镜、细胞计数仪等



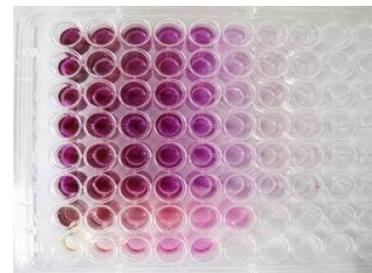
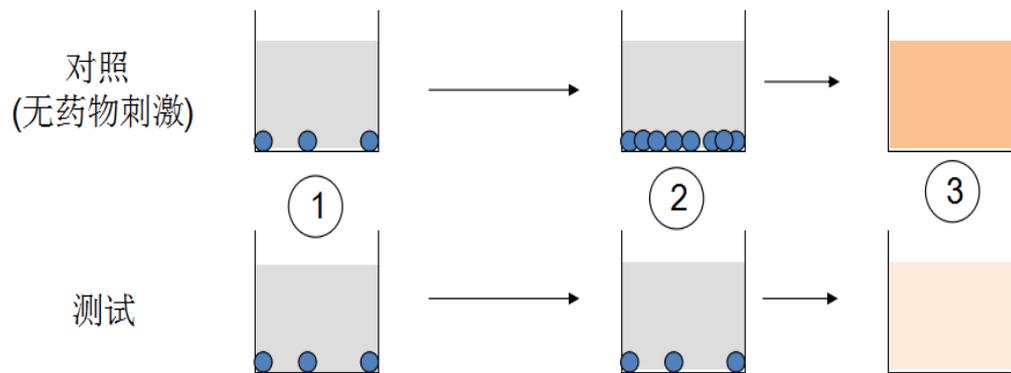
细胞增殖—活细胞计数方法

细胞活性检测方法：通过检测样品中健康细胞数目来评价细胞的增殖能力，细胞活性检测方法并不能最终证明检测样品中的细胞是否在增殖；

➤ 根据活性细胞中的酶活性

—— MTT、XTT、WST-1、CCK8 的显色反应

—— 光吸收强度和活细胞的数目成正比



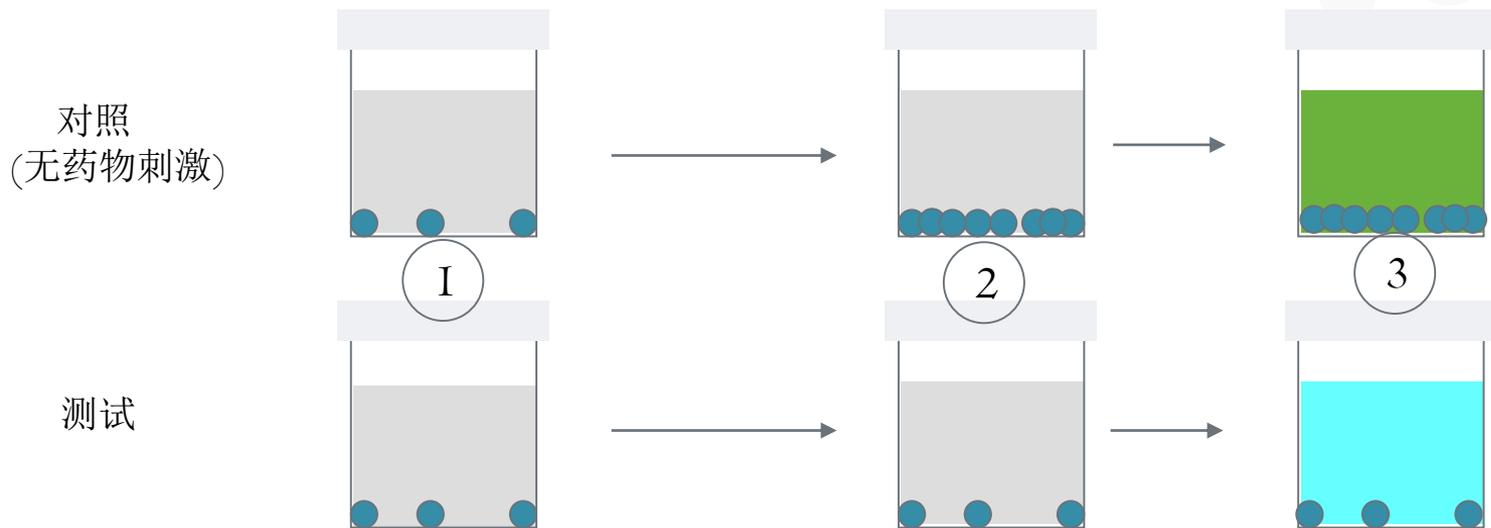
用途：

1. 药物（也包括其他处理方式如放射线照射）对体外培养的细胞毒性的测定
2. 细胞活力、药物对细胞毒性作用测定

常用检测方法比较

检测方法	MTT	XTT	CCK8
甲贍产物的水溶性	差（需加有机溶剂溶解）	好	好
产品性状	粉末	2瓶溶液	1瓶溶液
使用方法	配成溶液后使用	现配现用	即开即用
检测灵敏度	较高	高	高
检测时间	较长	较短	最短
检测波长	560-600nm	420-480nm	430-490nm
细胞毒性	高，细胞形态完全消失	很低，细胞形态不变	很低，细胞形态不变
试剂稳定性	一般	较差	很好
批量样品检测	可以	非常适合	非常适合
便捷程度	一般	便捷	非常便捷

荧光法—细胞活力、毒性检测方法



特点：荧光强度与活细胞数成正比、灵敏度高、特异性好、组合成复合荧光染料使用

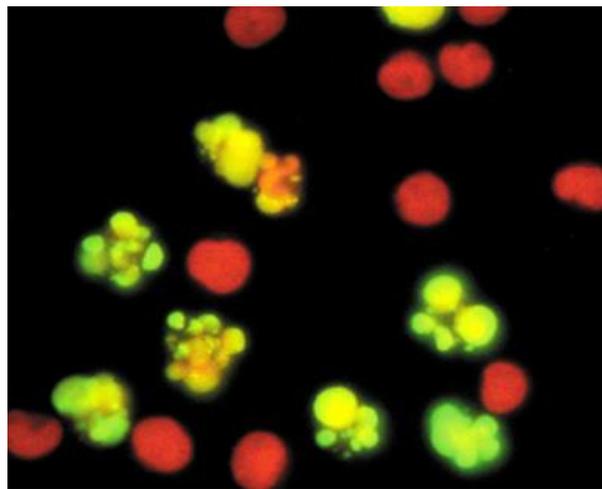
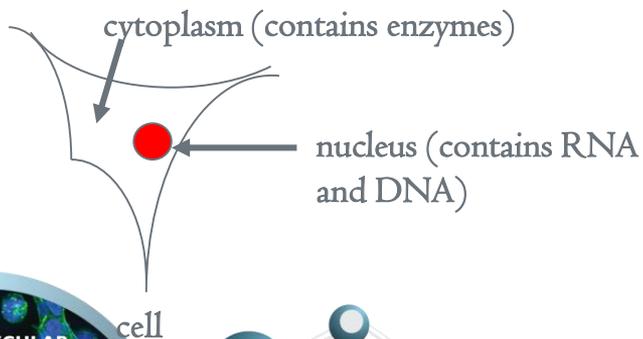
常见染料：Hoechst、DAPI、PI、Alamar Blue、Calcien AM 等等

用途：该分析用于筛选具有抑制细胞活力的候选药物

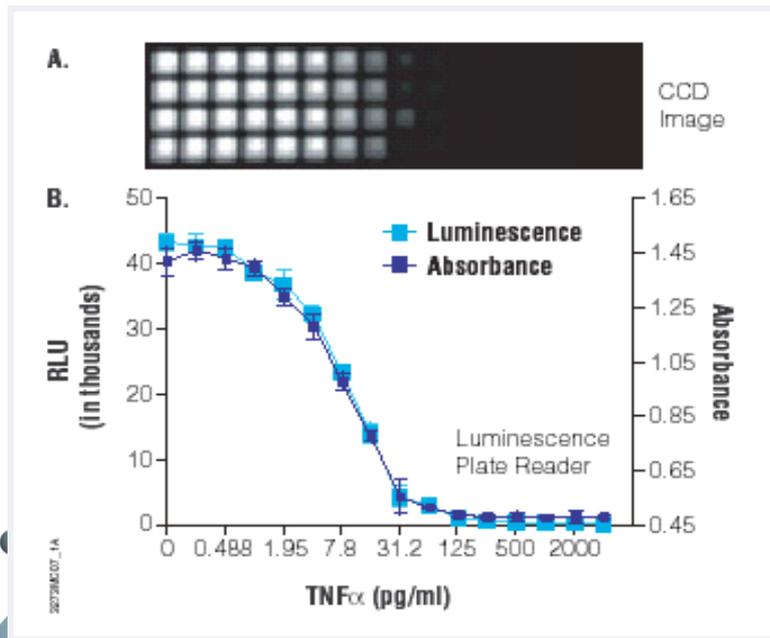
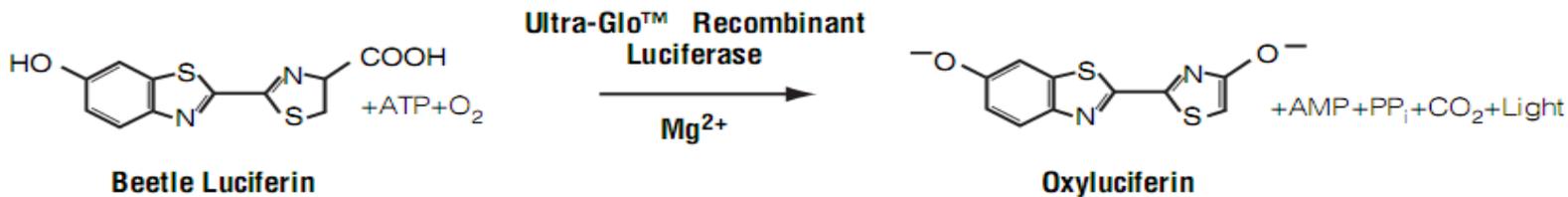
细胞活性/毒性

荧光检测可使用多个标记进行同时测量!

- 根据细胞膜完整性差异，荧光染料对活细胞/死细胞的穿透特性不同，对其进行特异性标记，有常规荧光染料也有优化试剂盒。
- EarlyTox™ Live/Dead 检测试剂盒
 - **Calcein AM** (495/530nm) 可以透过细胞膜，进入细胞后被特定的酯酶水解，生成强烈 **绿色荧光** 的Calcein释放，用于活细胞数的定量。
 - **EthD-III** (530/645 nm) 是一种死细胞特有的染料。它将和由于细胞死亡所释放的DNA结合生成 **红色荧光** 信号，用于死细胞数的定量。
 - 同时获得%Live Cell和%Dead Cell



利用萤光素酶报告基因—细胞内ATP检测



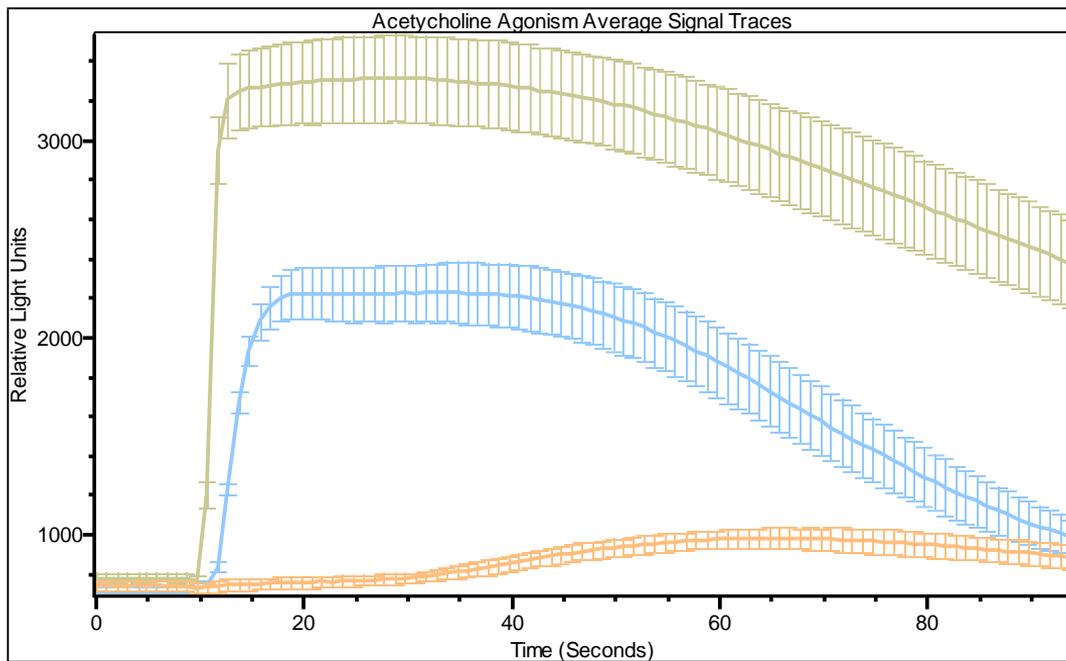
	CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	BacTiter-Glo® Microbial Cell Viability Assay
Characteristic		
Incubation	10 minutes	5 minutes
Parameter measured	ATP	ATP
Sensitivity: 96-well/384-well	50 cells/15 cells (also 1536-well format)	~40 cells/N.D.
Sample Type	suspension or adherent cells	bacteria, yeast
Detection	luminescent	luminescent

细胞信号转导通路

— 激酶、NFkB、cAMP、Ca²⁺

钙流信号—荧光法

- 钙流是快速动力学检测范畴
- 需要仪器加样与检测必须同时进行



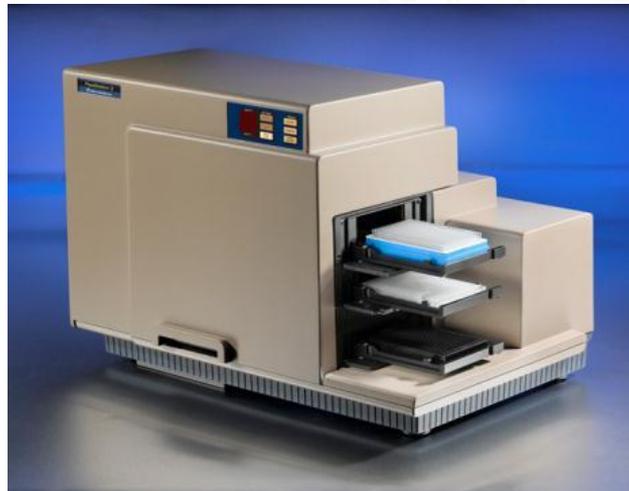
FlexStation 3 钙流检测工作站

◆ FlexStation 3 常规实验应用

- 光吸收
- 荧光
- 化学发光
- 时间分辨荧光
- 荧光偏振

◆ FlexStation 3 快速动力学实验应用

- ✓ 钙流检测
- ✓ 离子通道 (Na⁺、K⁺等)
- ✓ 膜电势
- ✓ 双报告基因检测

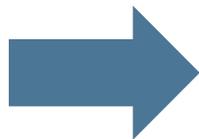


钙流检测

- 传统染料

需要水洗步骤

- Fura-2 (比值法)
- Fluo-3
- Fluo-4
- Indo-1 (比值法)
- Calcium Green



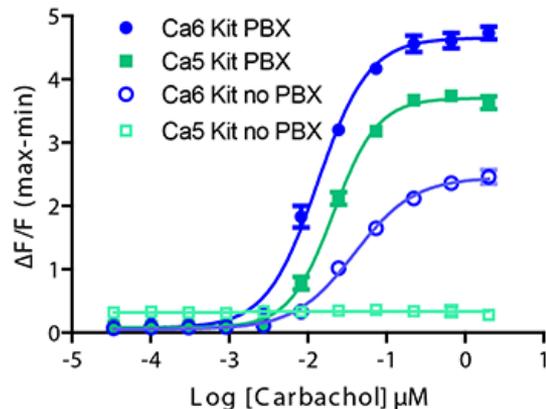
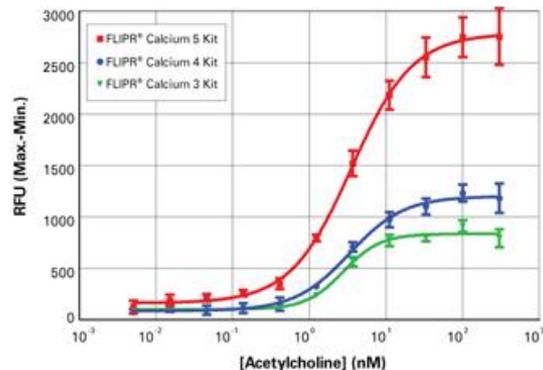
- Grow confluent monolayer of cells
- Next day remove growth medium
- Incubate cells with calcium sensitive dye
- Remove extracellular dye
- Repeated washing with buffer
- Read on instrument

- Fura-2和Ca²⁺结合会发生吸收峰的位移 (EX:380→340nm, EM:510nm)
- Fluo-3游离配体形式存在几乎无荧光, 与Ca²⁺结合之后, 荧光会增加60-80倍
- Fluo-4是在Fluo-3的基础上改良的, 加载更快, 相同条件下荧光更明亮
- Indo-1和Ca²⁺结合会发生发射峰的位移 (EX:350, EM: 475→400nm)

钙流检测试剂盒

- FLIPR Calcium Assay Kits:
 - “Mix-and-read” 无需水洗
 - Calcium 3 Assay Kit
 - 针对强健细胞
 - Calcium 4 Assay Kit
 - 提高了信噪比
 - 尤其适合钙离子通道、趋化因子（chemokine）受体和瞬时转染受体等
 - Calcium 5 Assay Kit
 - 针对众多弱响应细胞 / 受体或受体表达少的情况
 - Calcium 6 Assay Kit
 - 同类产品里最高的量子效率
 - 低信号筛选，包括内源性、原代或干细胞靶点
 - 不受阴离子交换蛋白影响

- Add reagent mixture to seeded cells
- Incubate
- Read on instrument



微生物学

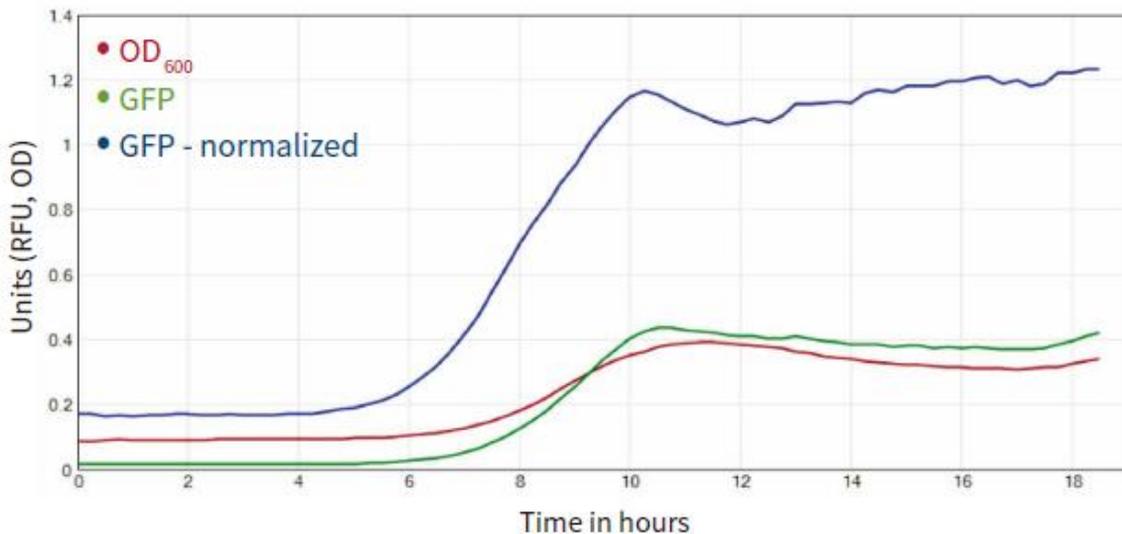
——细菌增殖、内毒素、支原体检测

细菌生长曲线——光吸收+荧光法

- 含有质粒 pMV 158 - GFP 的粪肠球菌菌株OGIRF
- 连续18个小时动力学监测细菌的生长情况
- OD600吸光度和GFP蛋白表达同时检测
- 归一化反应：GFP / OD600

APPLICATION NOTE

Advanced kinetic analysis of a bacterial growth assay



内毒素检测——动态浊度法



- 原理：鲎试剂（Limulus Amebocyte Lysate）可用于检测革兰氏阴性细菌细胞壁的成分脂多糖（内毒素）。LAL与内毒素反应后会对一定波长产生光吸收（浊度），常用动态浊度法进行检测，即检测达到一定浊度所需要的时间，时间越短说明样品内毒素含量越高。与标准曲线比对后可定量样品内毒素含量。

- 检测波长：**405nm**或**325nm**

- 应用：产品质量控制

- 试剂盒推荐

进口—美国ACC, Lonza

国产—湛江安度斯

厦门鲎试剂

LINEAR CORRELATION
EXAMPLE CALCULATIONS

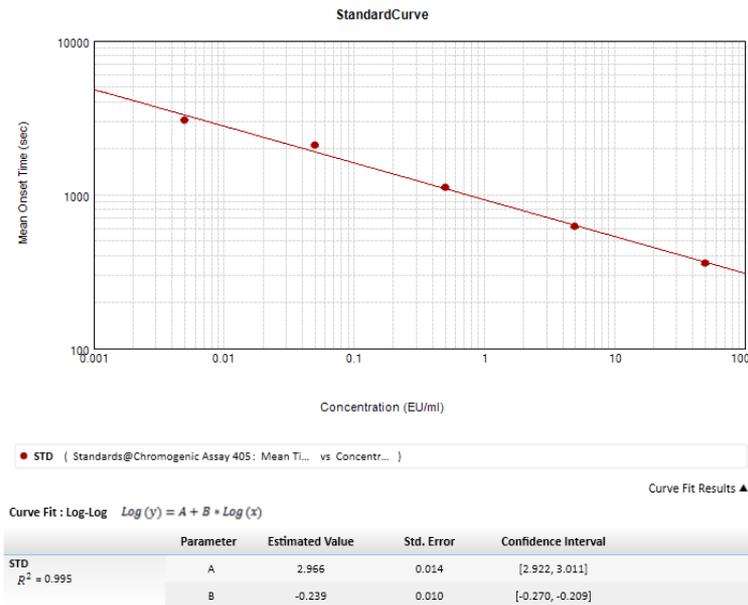
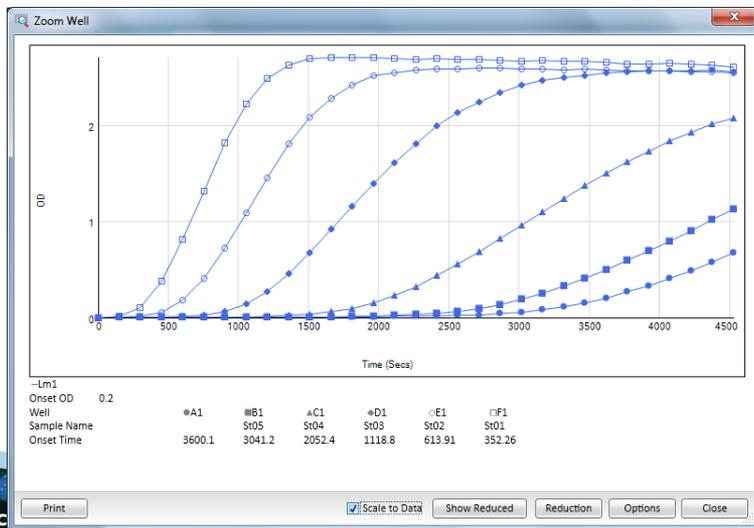
Standards	Concentration	Mean Reaction Time (Sec)	Log Concentration	Log Mean Reaction Time
Neg. Control	—	Unreactive	—	—
S1	0.010 EU/ml	3103	-2.000	3.492
S2	0.100 EU/ml	1484	-1.000	3.171
S3	1.000 EU/ml	808	0.000	2.907
S4	10.000 EU/ml	485	1.000	2.686
S5	100.000 EU/ml	312	2.000	2.494
Samples				
1	—	1576	—	3.198
2	—	943	—	2.975

内毒素检测——动态显色法

- Lonza Knetic-QCL™动态显色法LAL检测试剂盒
- 将样品与LAL /底物试剂混合，置于酶标仪中，并随时间监测溶液变成黄色，表示测定完成
- 相比动态浊度法和凝胶法，它不会干扰凝胶的形成
- 灵敏度范围为0.005 EU / ml - 50.0 EU / ml，是LAL检测中最敏感的检测方法
- 405nm检测



显色法



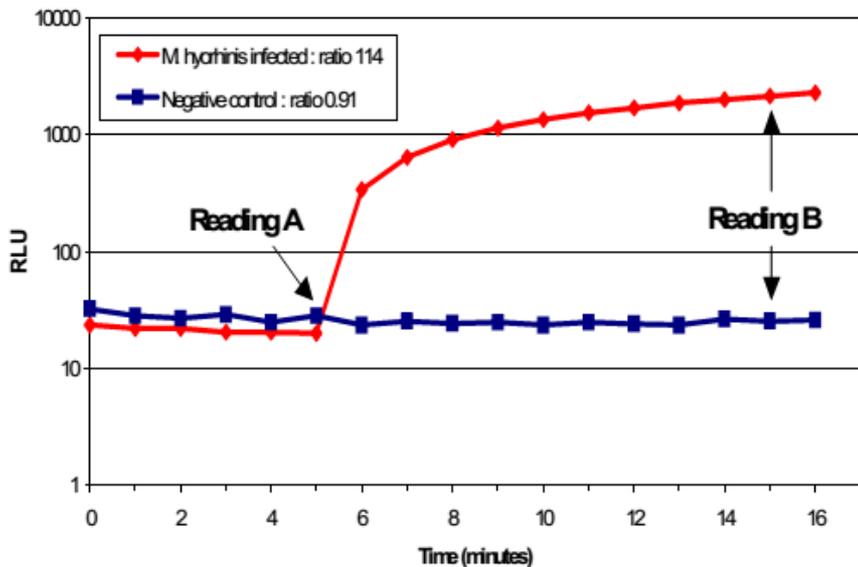
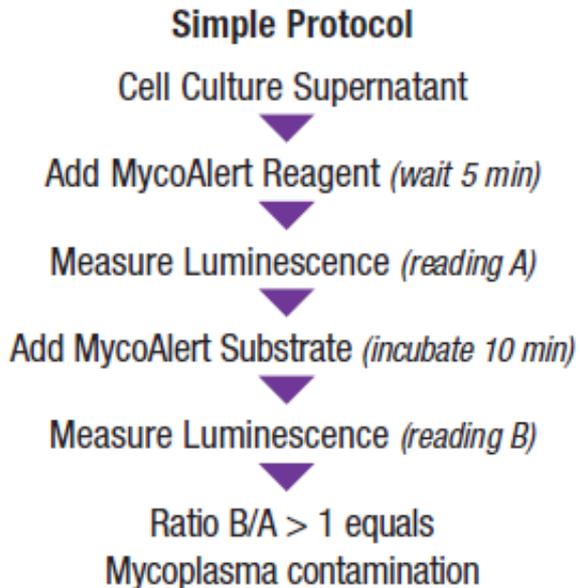
支原体检测

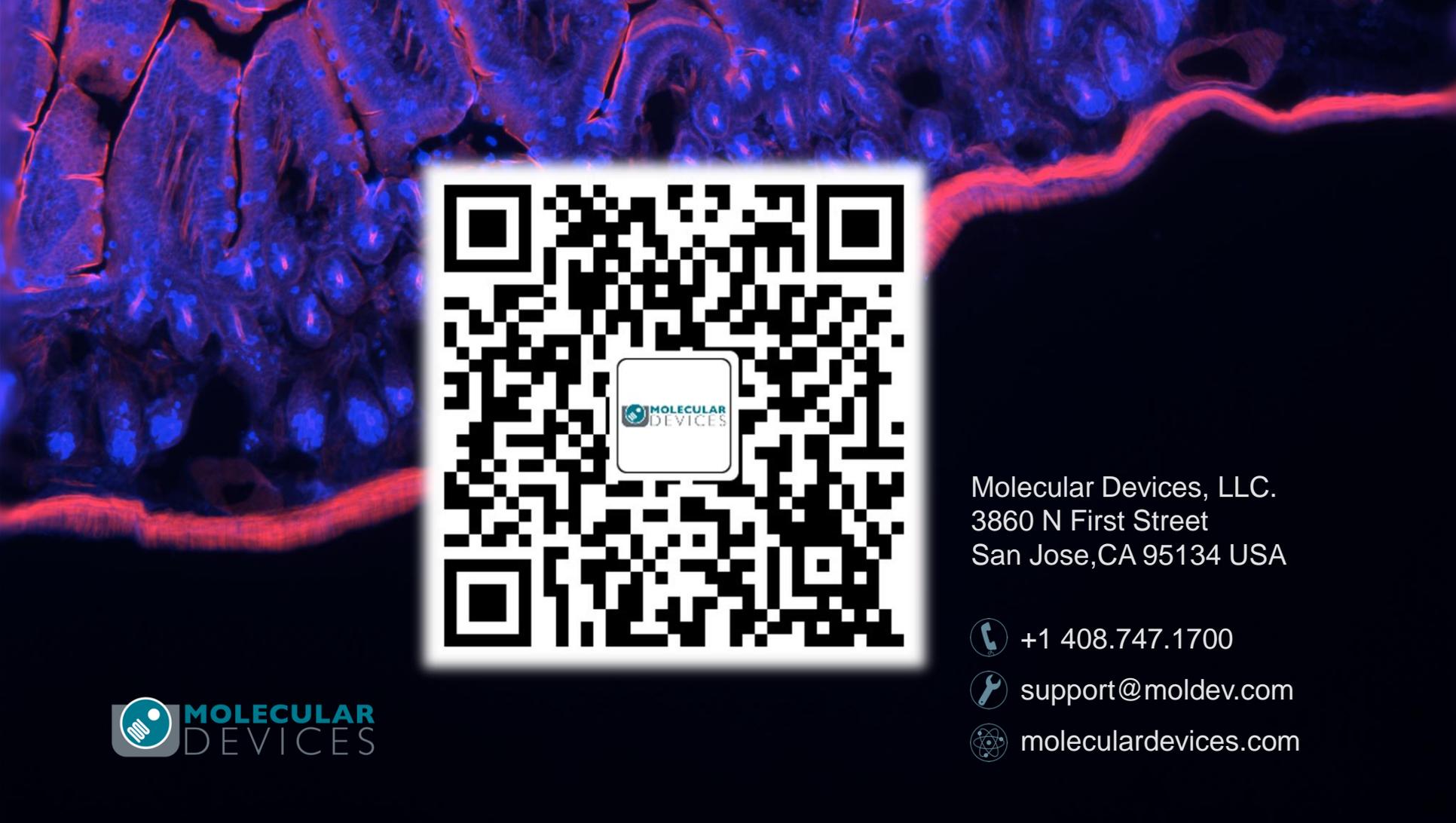
MycoAlert
Mycoplasma Detection
Kit



原理:

- 活的支原体可以催化试剂盒提供的底物，并将ADP转化为ATP
- 分别检测底物加入前和加入后的ATP水平
- 比较前后ATP水平的变化即可得知样本中是否含有活的支原体





Molecular Devices, LLC.
3860 N First Street
San Jose, CA 95134 USA

-  +1 408.747.1700
-  support@moldev.com
-  moleculardevices.com

