

MicroPlate Reader기의 이해

2013. 12. 31

Il Shin Kim

UNIST Central Research Facilities (UCRF)





Commonly used absorbance assays

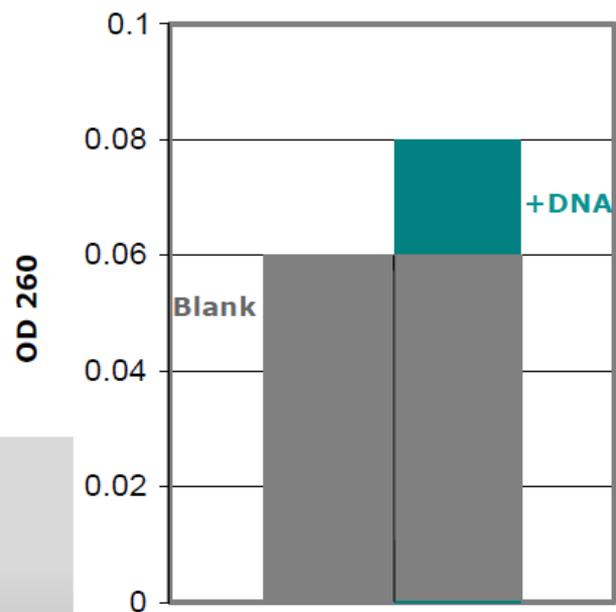
- Nucleic acid and protein quantitation
- Enzyme assay
- ELISA
- Reporter gene assay
- Cell viability
- LAL endotoxin

Nucleic acid detection

- **Double-stranded DNA, oligonucleotides, RNA in solution are detected using UV wavelengths**
 - Purine and pyrimidine bases of nucleic acids have absorption maximum at 260 nm
 - Common calculations are concentration ($A_{260} \times EC$) or purity (A_{260}/A_{280})
 - At 260 nm, an OD reading of 1.0 is *generally* calculated as
 - 50 ug/mL of dsDNA
 - 40 ug/mL RNA
 - 20 ug/mL oligonucleotide
 - But this depends on the *extinction coefficient*
- **Endpoint assay, may use PathCheck**
- **Protocol available in SoftMax Pro**

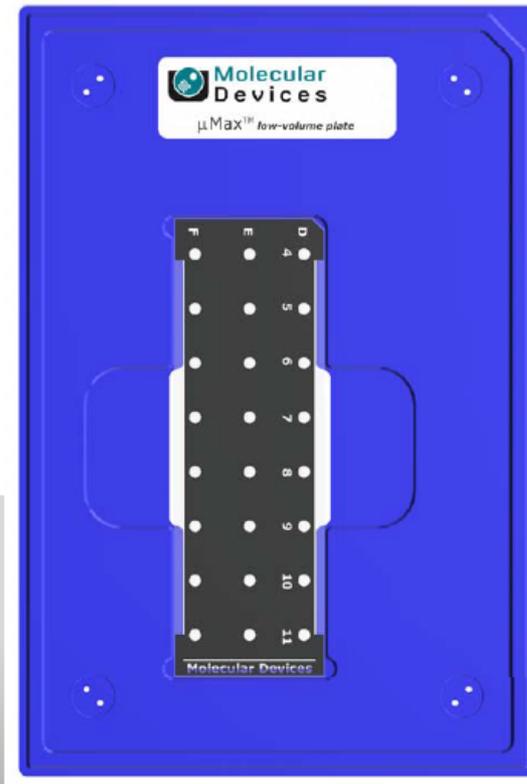
DNA must be measurable above the Blank

- **Typical blank measurements: Plastic gives ~0.06 OD**
 - TE buffer can add another 0.04 OD
- **To measure DNA, it must be detectable above the background**
- **Lower Limit of Detection (LLD) depends on measurement variability**



MicroMax Specifications

- **SBS format holder + 2 slide design**
 - 24 or 64 spot microplate
 - 2 μ l or 4 μ l configurations
- **Sensitivity**
 - 2ng/ μ l (dsDNA)
- Easy to clean
- Replaceable slide design
- SpectraMax plus 384 compatible

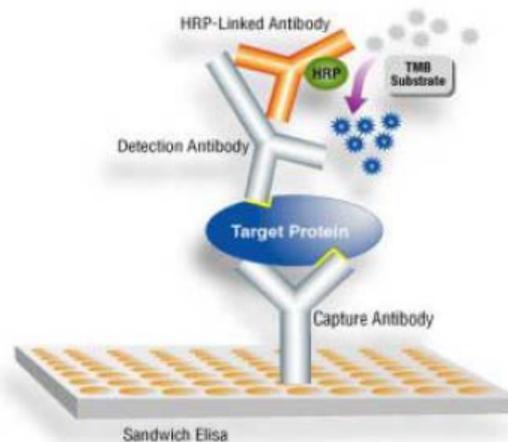


Protein detection

- **Direct method: read absorbance at 280 nm**
 - Tryptophan and tyrosine residues present in most proteins have absorption maxima at ~280 nm
 - At 280 nm, an OD reading of 1.0 means ~1 mg/mL protein
 - Range is 50 mg/mL to 2 mg/mL
- **Colorimetric assays**
 - **Bradford assay uses Coomassie blue**
 - Binds specific amino acids
 - Color changes from brown to **blue (595 nm)** upon binding
 - **BCA and Lowry assays use copper**
 - Reduced in the presence of protein
 - Reduction yields a **blue color**
- **All protocols available in SoftMax Pro**

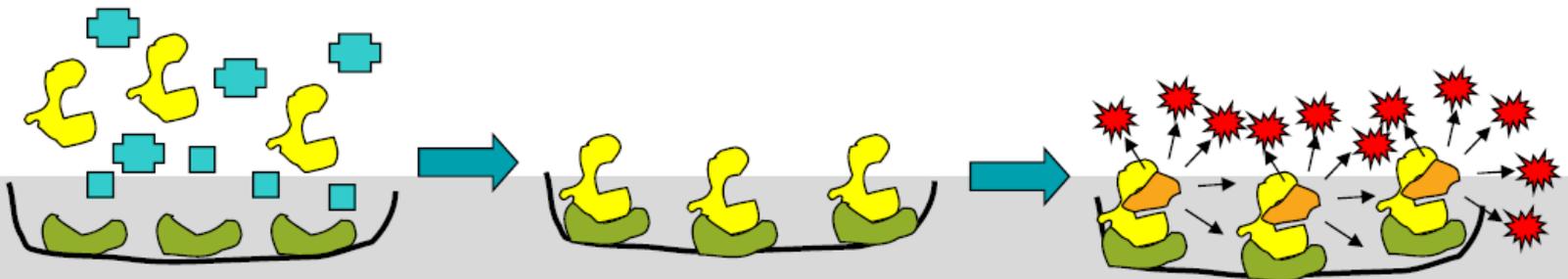
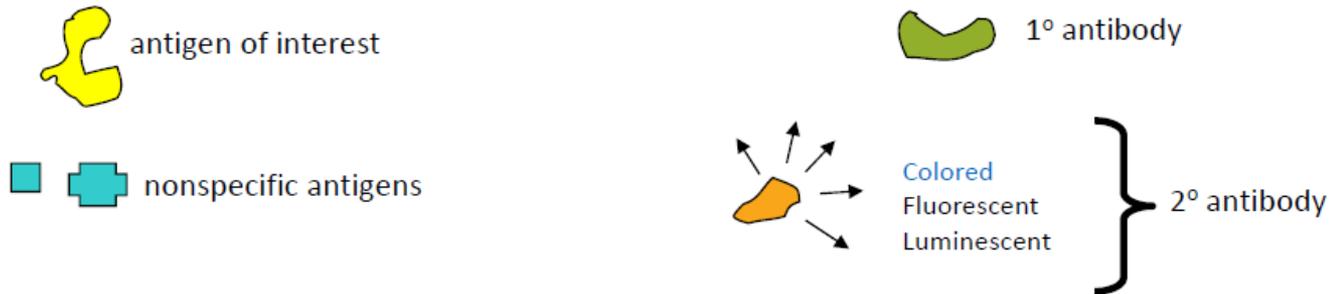
ELISA

- **Enzyme-Linked Immunosorbent Assay**
 - Quantitation of antigen present in serum, cells, etc.
 - **Colorimetric**, fluorescent, or luminescent
 - Endpoint or kinetic
 - Protocols available in SoftMax Pro
 - Antigens can be any immunogen: proteins, peptides, bacteria, viruses, etc.



More detail on next slide...

How an ELISA works



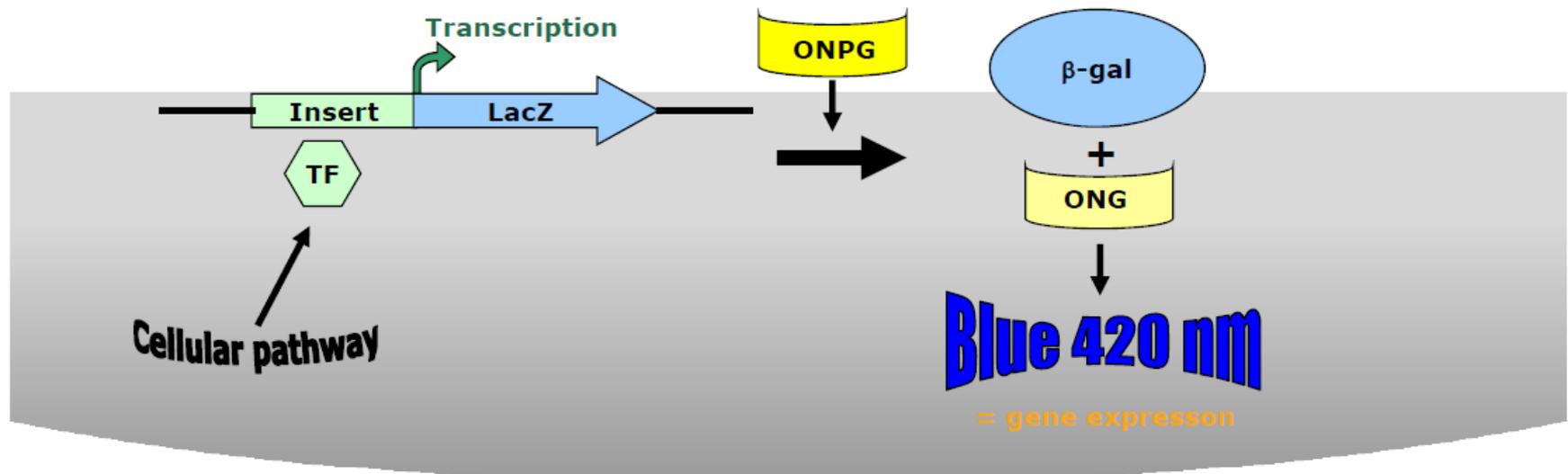
- 1° antibody can be bound to bottom of well
- sample containing antigen of interest is added

- antigen binds specifically to 1° antibody
- nonspecific antigens are washed away

- 2° antibody specifically binds antigen and catalyzes conversion of a substrate to give a colored signal

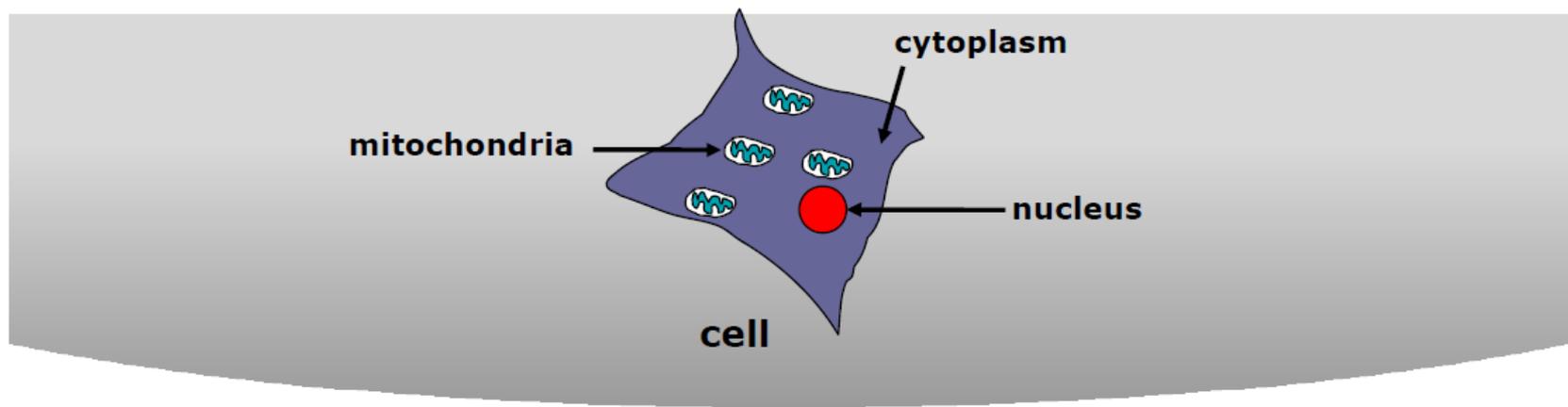
Reporter gene assays: LacZ/ β -galactosidase

- Purpose is to detect regulation, expression of a gene of interest
- Promoter or response element for gene of interest is attached to LacZ gene = reporter construct
- Reporter construct is transfected into cells
- Cells are treated or allowed to grow normally
 - Activation of response element (gene of interest) causes transcription of LacZ gene
 - LacZ gene codes for β -galactosidase
- Cells are fixed and substrate (ONPG) for β -gal is added



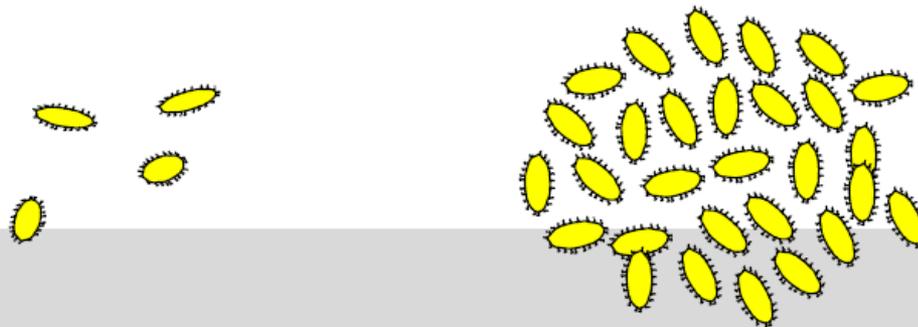
Eukaryotic cell viability assay

- **MTT reduction**
 - Monitor number of live mammalian cells in culture
 - Study effects of cytotoxic drugs
 - Endpoint assay
 - MTT is a **tetrazolium salt** reduced by mitochondrial dehydrogenase present only **in live cells** ⇒ **Colored**
 - Read absorbance at **570 nm**, with background (nonspecific) reference reading at 630 nm



Bacterial cell growth assay

- Absorbance reading at 600 nm (OD_{600})
- Can use standard curve of known concentrations to relate turbidity to actual number of cells



**Few bacterial cells
= low A_{600} reading**

**The higher the cell density,
the higher the A_{600} reading**

SoftMax Pro 6.1을 이용한 Plus³⁸⁴ 사용설명

1. 기기(Plus³⁸⁴)와 컴퓨터의 전원을 켭니다.
2. 전원이 들어오면 기기는 auto calibration을 합니다.
3. Auto calibration이 완료되면, 컴퓨터에 SoftMax Pro 6.1을 구동시킵니다.
4. SoftMax Pro 6.1이 구동되면 (Fig. 1) 과 같은 화면이 나타납니다.

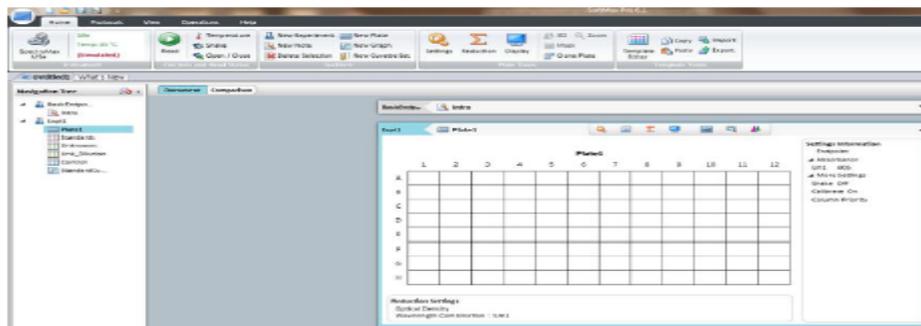


Figure 1. SoftMax pro 6.1 first window

5. 기기와 컴퓨터와의 연결에 이상이 없을 때에는 왼쪽 상단에  이와 같은 그림이 나타나지만 만약 이상이 발생할 때에는  와 같은 그림이 나타납니다. 이런 경우에는 기기와 컴퓨터의 연결을 다시 한번 더 확인해 보시기 바랍니다.
6. 정상적으로 SoftMax pro 6.1이 구동 되었다면, 실험에 들어가기에 앞서 protocol setting이 필요합니다.
7. Protocol은 Plate1 화면에서 setting을 하게 됩니다 (Fig. 2).

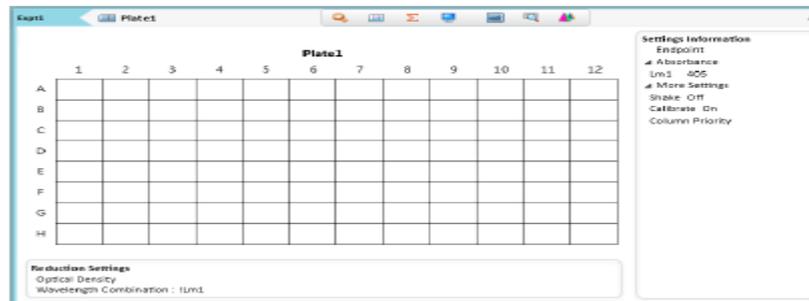


Figure 2. Plate1 window

8. **Plate1** 화면에 각각의 icon들은 다음과 같은 특성을 가지고 있습니다.

- ①  : 기기의 setting을 할 수 있습니다.
- ②  : Plate mapping을 할 수 있습니다. (ex, Standard, Control,...)
- ③  : 원하는 data만을 setting 할 수 있습니다. (ex, Lm1-Lm2,...)
- ④  : Data display를 setting 할 수 있습니다.
- ⑤  : 특정 well data만을 masking 할 수 있습니다.
- ⑥  : 측정 data를 3D image로 전환하여 확인할 수 있습니다.

9.  을 click 하면 아래와 같은 화면이 나타납니다 (Fig. 3).

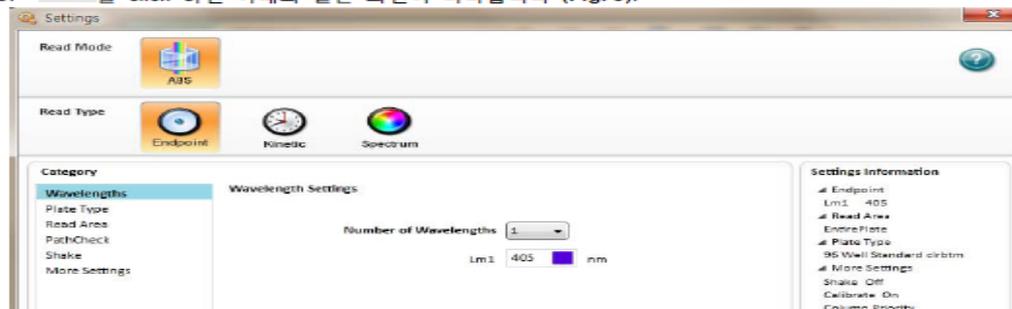


Figure 3. Setting window

10. **Read Mode** 중에서 실험하실 mode를 선택합니다.

- ①  : **ABS, Absorbance mode**, 흡광 측정

11. **Read Mode** 선택 후 **Read Type**을 선택합니다.

- ①  : **Endpoint**, Well 중앙의 sample을 detection하는 방법이며, 모든 read mode에서 측정이 가능한 방법입니다.
- ②  : **Kinetic**, 일정 시간을 setting하여 그 시간 내에 특정 interval로 detection하는 방법입니다 (Fig. 4).
 - i. **Total Run Time** : 총 실험 시간을 설정합니다.
 - ii. **Interval** : Total run time안에서 특정 시간마다 sample을 reading할 수 있습니다.
 - iii. 일반적으로 kinetic read 결과는 **Vmax**값을 보여줍니다.

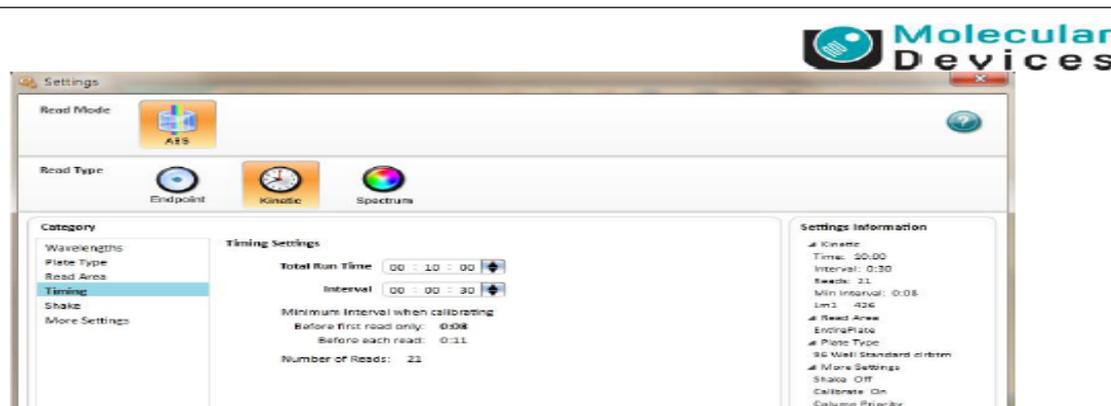


Figure 4. Kinetic read, timing setting window

③ Spectrum : Spectrum, 최적의 파장을 찾기 위한 spectrum scan mode입니다 (Fig. 5).

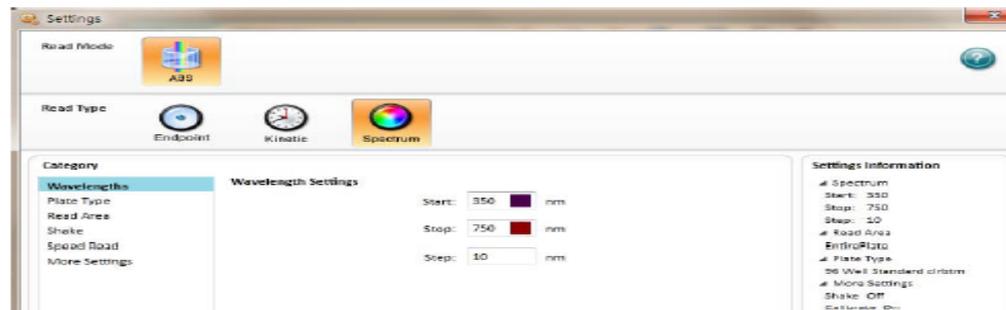


Figure 5. Spectrum read, wavelength setting window

12. Read type 선택 후 Category setting을 합니다.
13. Wavelength (1nm 단위로 직접 typing 할 수 있습니다.)
 - ① Absorbance - 흡광 파장 (최대 6종류)

14. Plate Type & Read Area

: 실험에 이용되는 microplate 종류와 target well selection을 할 수 있습니다. Plate type은 96, 384 well microplates 만 사용이 가능하십니다. 특히 UV 파장을 이용한 실험을 위해서는 반드시 전용 UV plate를 이용하여야 합니다.



15. Pathcheck (Absorbance read mode에서만 사용)

: Pathcheck기능은 Water constant 이용하여 microplate에서 absorbance reading시 microplate에 sample variation을 normalization시켜 줄 수 있는 방법입니다.

16. Shake

: Before first read를 선택하시고 시간을 setting하시면 그 시간만큼 microplate shaking이 실행됩니다.

17. More settings

① Calibrate

- i. Read Order : 여러 종류의 파장을 setting하였을 때 각 column을 먼저 읽고 그 다음 파장으로 읽을 것인지 아니면 well 마다 모든 파장을 읽은 뒤 다음 well을 읽을 것인지 선택할 수 있습니다. 일반적으로 column read setting을 합니다.

18.  을 click 하면 아래와 같이 Template Editor 화면이 나타납니다 (Fig. 6).

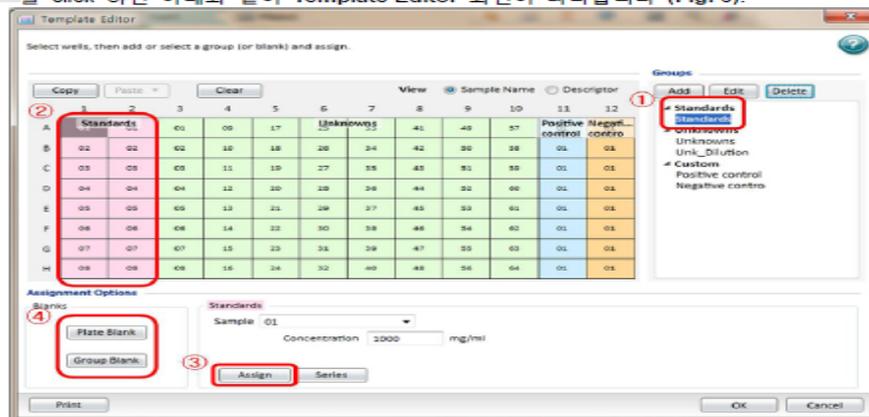


Figure 6. Template Editor window

19. Sample grouping을 위해서는 다음과 같은 단계로 진행하시면 됩니다.

- ① 원하시는 group을 Groups에서 선택하시거나 추가 하실 수 있습니다.
- ② Well location을 mouse를 이용해 drag 하십니다.
- ③ Assign button을 누르시면 standards group이 형성되며 특정 색깔이 정해집니다.
- ④ 또한 background reduction을 위해서 Plate Blank (plate 전체 blank)나 Group Blank (group 별 blank)를 선택하실 수 있습니다.

20. 이 상태에서 농도 별로 setting을 원하신다면 Series button을 누르신 후 다음과 같이 진행하시면 됩니다 (Fig. 7).

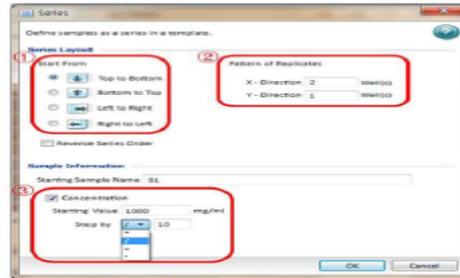


Figure 7. Series window

- ① Fig.6 에 Standards group을 기준으로 위에서 아래로 농도 별 선택을 한 뒤에 (Top to Bottom)
- ② Pattern of Replicates를 통하여 x축 두 개의 well은 서로 같은 농도 (y축)로 선택합니다.
- ③ Concentration을 정하기 위해서 Starting Value를 선택한 뒤에 연산자(*, /, +, -)를 이용하여 setting 하십니다. 이렇게 선택하시고 OK button을 누르시면 Fig.6과 같이 standards group 기준으로 농도 별 setting이 완료됩니다.

21. Template setting이 완료되면 다음 그림과 같이 group 별 화면이 생성 됩니다 (Fig. 8).



Figure 8. Group windows

22. 이렇게 setting된 뒤에 관찰하고자 하는 plate를 기기에 넣으신 후 상단에 Read button만 선택하시면 sample reading이 시작됩니다.

23. Reading이 끝난 뒤에는 Exp1 > Plate1 화면에 다음과 같이 나타납니다 (Fig. 9).



Figure 9. After reading window



24. Fig. 9에 나타난 각각의 group의 raw data를 확인하고 싶으시면 각각의 group을 선택하신 후 아래 그림 (Fig. 10)과 같이 쉽게 확인하실 수 있으며, 원하시는 통계방법을 모두 적용하실 수 있는 Formula setting이 가능합니다.

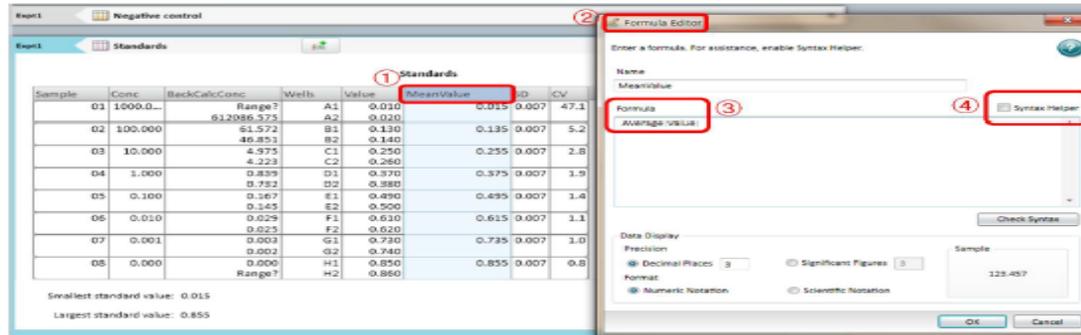


Figure 10. Formula window

25. Formula setting을 위해서는 다음과 같이 수행하시면 됩니다.

- ① Standards group에 MeanValue를 선택합니다.
- ② MeanValue를 double click 하면 Formula Editor가 나타납니다.
- ③ Value들의 평균을 구하기 위한 식 Average(Value)를 typing 합니다.
- ④ 이때 Syntax Helper를 누르시면 Formula setting에 큰 도움을 드립니다.

26. 또한 standard groups에서 나온 결과 값을 이용하여 standard curve를 그리고 싶을 때는 아래 그림 (Fig. 11)과 같이 StandardCurve group에서 fit 공식을 선택하여 fitting 하시면 됩니다.

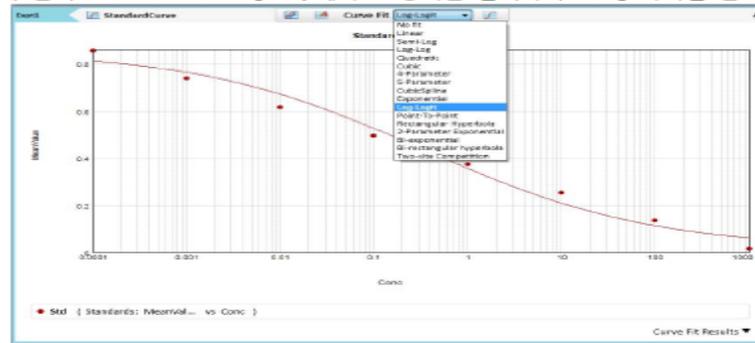


Figure 11. StandardCurve window

27. 이렇게 해서 모든 실험이 완료되면 SoftMax Pro 6.1와 기기를 종료시켜주시면 됩니다.

MicroPlate Reader기의 간단 메뉴얼

모 델 명	Spectra Max Plus 384	제 조 사	Molecular Devices
담 당 자	연구지원본부, 생체효능검중실 김일신 5211	업 체 명	팜텍 한재문 과장 051-343-0100

작 동 방 법	<ol style="list-style-type: none"> 1. 기기(SpectraMax Plus384)와 컴퓨터의 전원을 켭니다. 2. 전원이 들어오면 기기는 Auto calibration을 합니다. 3. Auto calibration이 완료되면, 컴퓨터에 SoftMax Pro6.x을 구동시킵니다. 4. 기기와 컴퓨터와의 연결에 이상이 없을 때에는 왼쪽상단에  이와같은 그림이 나타납니다. 5. 정상적으로 SoftMax pro 6.x이 구동되었다면, 실험에 들어가기에 앞서 protocol setting이 필요 합니다. 6. Protocol은 Plate1 화면에서 setting을 하게됩니다. 7. Plate1 화면에 각각의 icon들은 다음과 같은 특성을 가지고 있습니다. <table border="0" style="margin-left: 20px;"> <tr> <td style="width: 20px;">① :</td> <td></td> <td>기기의 setting을 할 수 있습니다.</td> </tr> <tr> <td>② :</td> <td></td> <td>Plate mapping을 할 수 있습니다. (ex, Standard, Control)</td> </tr> <tr> <td>③ :</td> <td></td> <td>원하는 data만을 setting 할 수 있습니다. (ex, Lm1-Lm2,)</td> </tr> <tr> <td>④ :</td> <td></td> <td>Data display를 setting 할 수 있습니다.</td> </tr> <tr> <td>⑤ :</td> <td></td> <td>특정 well data만을 masking 할 수 있습니다.</td> </tr> <tr> <td>⑥ :</td> <td></td> <td>측정 data 를3D image로 환하여 확인 할 수 있습니다.</td> </tr> </table> 	① :		기기의 setting을 할 수 있습니다.	② :		Plate mapping을 할 수 있습니다. (ex, Standard, Control)	③ :		원하는 data만을 setting 할 수 있습니다. (ex, Lm1-Lm2,)	④ :		Data display를 setting 할 수 있습니다.	⑤ :		특정 well data만을 masking 할 수 있습니다.	⑥ :		측정 data 를3D image로 환하여 확인 할 수 있습니다.
	① :		기기의 setting을 할 수 있습니다.																
② :		Plate mapping을 할 수 있습니다. (ex, Standard, Control)																	
③ :		원하는 data만을 setting 할 수 있습니다. (ex, Lm1-Lm2,)																	
④ :		Data display를 setting 할 수 있습니다.																	
⑤ :		특정 well data만을 masking 할 수 있습니다.																	
⑥ :		측정 data 를3D image로 환하여 확인 할 수 있습니다.																	
<ol style="list-style-type: none"> 8.  을 click 합니다. 9. Read Mode 중에서 실험하실 mode를 선택합니다. <ol style="list-style-type: none"> ① : ABS, Absorbance mode, 흡광측정 10. Read Mode선택 후 Read Type을 선택합니다. <ol style="list-style-type: none"> ① Endpoint, Well 중앙의 sample을 detection하는 방법입니다. ② Kinetic, 일정시간을 setting하여 그 시간내에 특정 interval로 detection하는 방법입니다. ③ Spectrum, 최적의 파장을 찾기 위한 spectrum scan mode. 11. Read type선택 후 Category setting을 합니다. 12. Wavelength (1nm 단위로 직접 typing 할 수 있습니다.-Absorbance-흡광파장(최대 6종류) 13. Plate Type & Read Area : Plate type은96, 384well microplates 사용 14. Sample grouping을 위해서는 다음과 같은 단계로 진행하시면 됩니다. <ol style="list-style-type: none"> ① 원하시는 group을 Groups에서 선택하시거나 추가하실 수 있습니다. ② Well location을 mouse를 이용해 drag 합니다. ③ Assign button을 누르시면 standards group이 형성되며 특정 색깔이 정해집니다. ④ 또한 background reduction을 위해서 Plate Blank(plate 전체blank)나 Group Blank(group 별 blank)를 선택하실 수 있습니다. 15. 이렇게 setting된 뒤에 관찰하고자하는 plate를 기기에 넣으신 후 상단에 button만 선택하시면 sample reading이 시작됩니다. 16. Reading이 끝난 뒤에는 Exp1 > Plate1 화면에서 확인 할 수 있습니다. 17. 또한 Standard groups에서 나온 결과값을 이용하여 standard curve를 그리고 싶을 때에는 Standard Curve group에서 fit 공식을 선택하여 fitting.하시면 됩니다. 																			
주의 사항	<ol style="list-style-type: none"> 1. 장비의 내부에 휘발성 물질 또는 이물질에 오염되는 것을 주의 2. 진동이 없는 환경에서 사용. 																		

Log book 작성

- 정확한 장비이용 방법을 습득한 후 장비이용
- 장비 옆에 비치되어 있음

순번	사용일자	시간	사용자	소속 / 연락처	비고
1	11월 26일	P.M 1:00 - 1:30	김영신	IVRC / 5211	
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					
25					
26					
27					
28					
29					
30					

- 장비이용을 할때 반드시 log book 을 작성할것
- 사용일자, 사용시간, 사용자, 소속 및 연락처, 비고