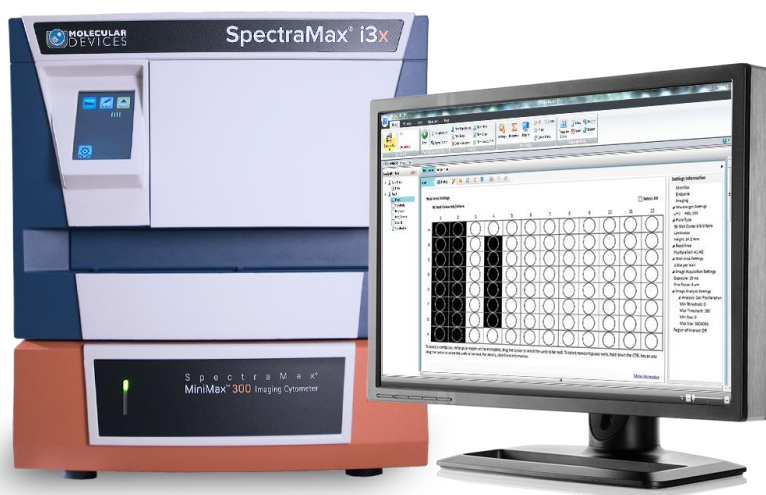


Molecular Devices

微孔板检测系统 i3x+MiniMax 操作简介

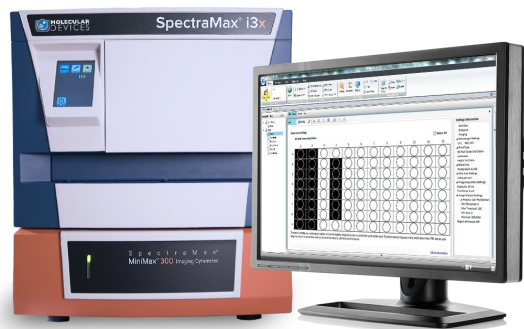
Version 2015.05



仪器和软件总体介绍	3
硬件操作步骤及注意事项	4
仪器安装连接	4
仪器保养注意	4
软件操作步骤	4
总体介绍	4
软件界面	5
1. 菜单栏	5
2. 图标栏	5
3. 文档区域	6
仪器检测参数设定	7
四种检测类别:	Error! Bookmark not defined.
1. 终点法检测	10
2. 动力学法检测	11
3. 波长扫描检测	11
4. 单孔多点检测	13
检测样品分组设定	16
1. 设定本底参照(BLANK)	20
2. 设定标准样品(Standards)及相应的标准曲线	21
3. 设定未知样品(Unknowns)并根据标准样品计算相应的浓度	28

仪器和软件总体介绍

仪器正面右上角标有型号名称：SpectraMax i3x。



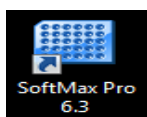
酶标仪需要用专门 USB 连接线(仪器自带)与电脑连接，下图为连接线示意图。



另外酶标仪对电源要求很高，我们要求的电源有接地，并通过不间断电源 UPS 来对仪器和电脑接点，防止：1) 大电流的冲击，2) 电压不稳，3) 突然断电。推荐 SANTAK 公司出品的 UPS 不间断电源，图片如下：



仪器的所用功能都可以通过专业软件 SoftMax Pro v6.3 来控制，软件安装后在桌面上会有如



下的图标：

硬件操作步骤及注意事项

仪器安装连接

仪器与电脑连接完毕并连接上高质量的电源以后,按仪器背面左下角的按钮可以直接启动仪器,经过约两分钟后的自检后就可以开始检测。一般仪器先开,再打开软件,仪器正常启动面板上的绿灯常亮,可以使用。

仪器保养注意

- 1) 有良好的电源。
- 2) 保持避光和干净的室内环境,维持一定的湿度(30%-80%)。
- 3) 维持室内比较恒定的温度,以 20-22 度为最适宜。
- 4) 适用 6-1536 孔板。96 孔微孔板内每孔可检测 100-300ul 溶液,最佳检测体积为 200ul。
- 5) 384 孔微孔板内每孔可检测 50-100ul 溶液,最佳检测体积为 80ul。
- 6) 检测后的微孔板不要长期置于仪器托盘中,检测完后就从仪器中取出,避免溶液蒸发腐蚀或损坏仪器内部光路系统。如果有腐蚀性或挥发性溶液,请带盖检测。
- 7) 对于可见光吸收检测,使用全透明微孔板;紫外光吸收检测,使用紫外可透全透明微孔板;荧光强度和荧光偏振,使用黑色不透明板,需要检测底读的用黑色底透微孔板;化学发光和时间分辨荧光,使用白色不透明微孔板。

强烈建议!!! 使用优质电源的情况下,保持仪器使用环境洁净、干燥,长期不使用的話,截断电源后使用防尘罩保护。

软件操作步骤

总体介绍

以 SoftMax Pro v6.3 做本次操作简介的蓝本。

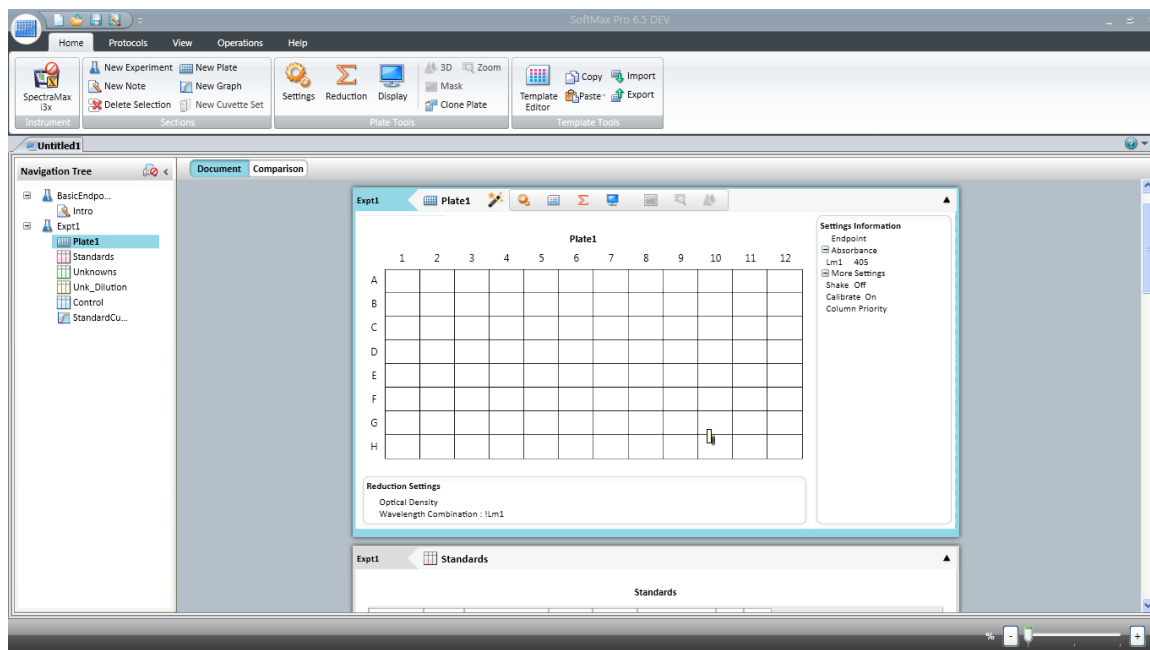


双击桌面图标可以打开以下软件操作界面:

文档区域即所有检测条件的设定,样品类型的设定,实验结果,数据分析结果区域,文档可以另存为两种格式:

- 1) *.sda 格式,即数据格式。该文档含有包括参数设定,实验数据,结果分析等所有实验内容。
- 2) *.spr 格式,即模版格式。该文档含有参数设定,分析公式等实验设定内容,可以应用


于多次重复实验而使用统一模版。
上面两种格式，只能使用 SoftMax pro 软件打开。



软件界面



1、菜单栏

点 击  下拉菜单打开：另存，保存，输出，打印等命令。

‘Home’下拉菜单内含剪切，复制，粘贴，删除，重新计算等命令。

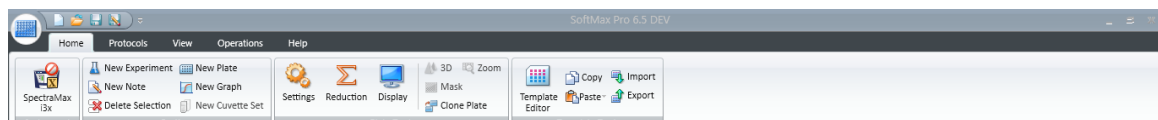
‘Protocols’下拉菜单内含超过 120 种可以应用于各类生化和细胞实验的模版。

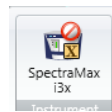
‘View’下拉菜单内含关于页面显示的命令。

‘Operations’下拉菜单内含连续读板和读板机控制按钮。

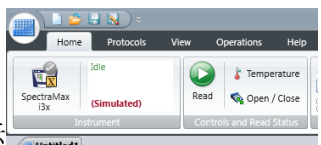
‘Help’下拉菜单内含软件版本号，SoftMax Pro User Guide 和 Formula Reference Guide.

2、图标栏

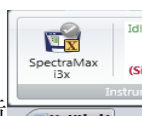




如果仪器和电脑连接不正常的时候图标栏显示为：这可能是因为连接不好，仪器未开机，仪器型号设定不对或串口设定不对引起。可以点击这个图标，出现下面对话框，

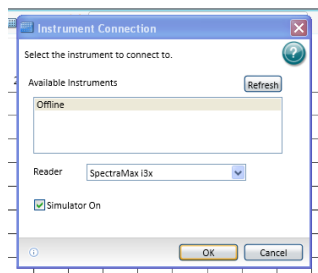


重新连接正常后会显示



1) 单击

2) 可进入如下界面：



然后选择 USB-SpectraMax i3x，确定。

3) 参数设定

- a) 在该界面可以修改 Reader 的型号，包括 Molecular Devices 所有类型（单功能和多功能）的酶标仪。选择您所购买的那款酶标仪型号，本例为 SpectraMax i3x。
- b) 在 Available instrument 下面会显示相应的软件识别到的机器型号，鼠标点击选择。然后，点击 ok，机器会自动连接上软件。

4) 实验检测参数都设定完毕后，把微孔板放入机器，i3x 可以自由放置微孔板的方向，只要在软件读数前出现的对话框里选择和实际板子 A1 位置对应一致即可。然后按可以启动仪器进行检测。



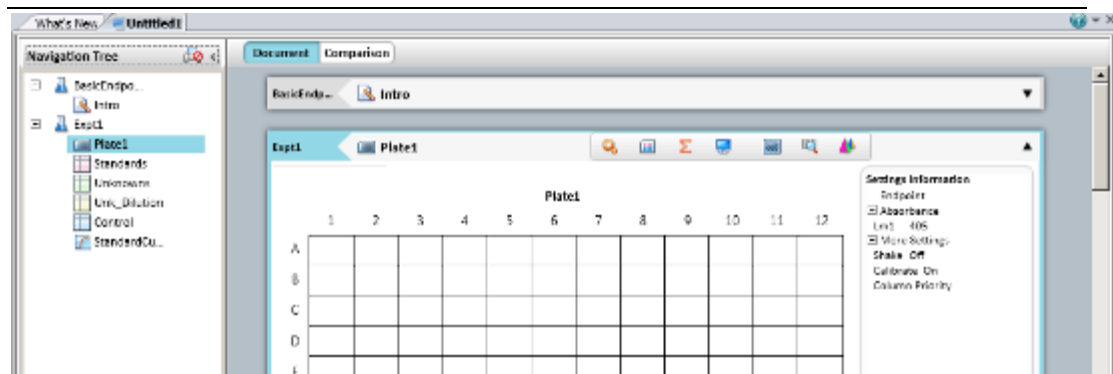
5) 仪器可以设定温度，均在室温以上加温，相应温度范围请查阅用户所使用仪器，按可以出现对话框选择开启温度控制或者关闭温度控制。当开启温度控制后需使仪器的微孔板托架置于关闭状态保持所设温度。



6) 按 **Open/Close** 可以控制仪器的微孔板托盘打开和关闭。

3. 文档区域

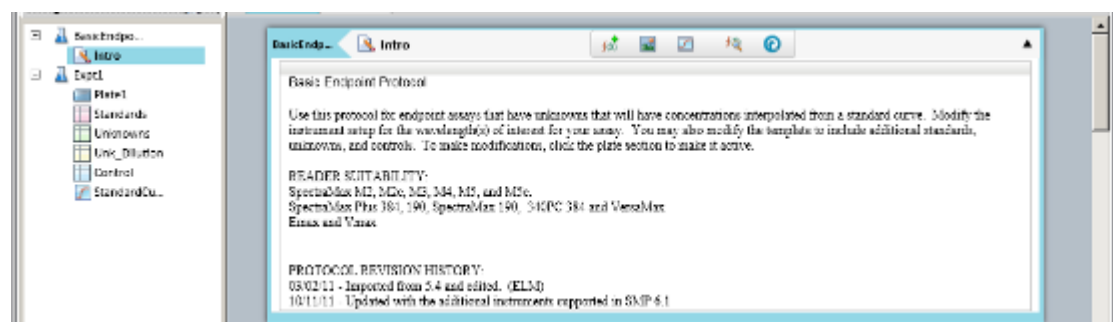
文档区默认为 1 个实验 Experiment，即：



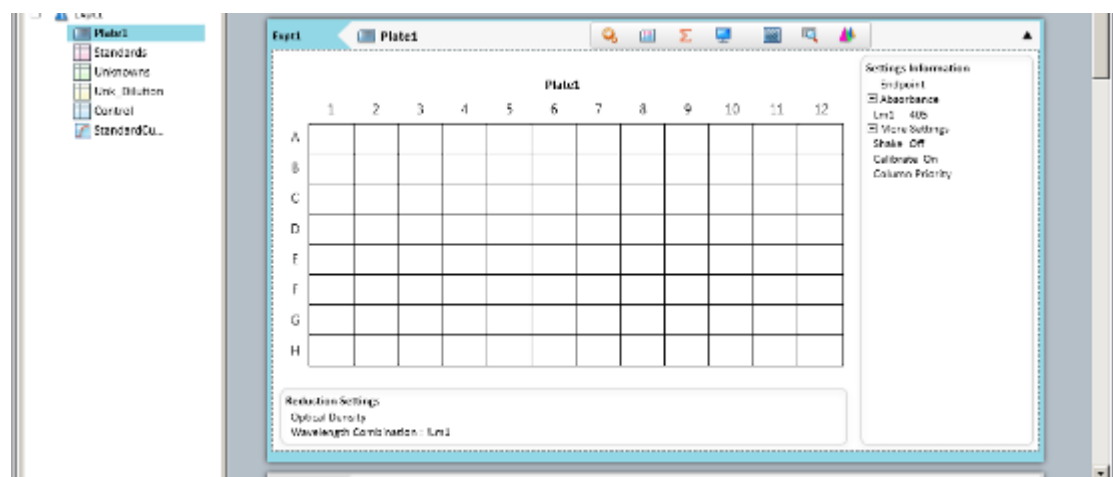
可以在软件上部菜单栏里选择增加实验即选择 New experiment。

每个实验分为三个部分：

1) 'Note'，在这个区域中可以写入实验记录，如实验名称、所用样品、实验时间、实验总结等。

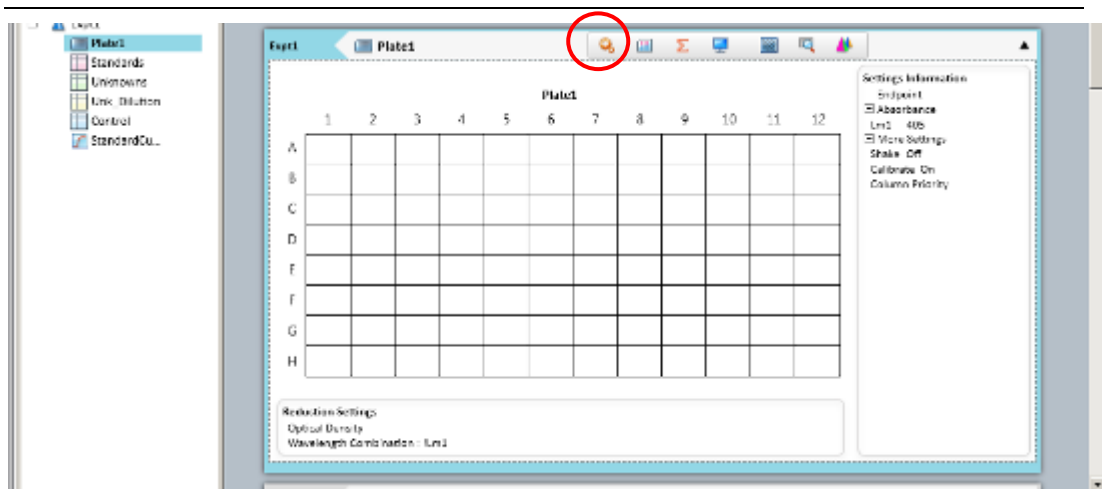


2) 'Platet1'，在这个区域中可以编辑对微孔板进行检测设定和对所检测样品的分组。

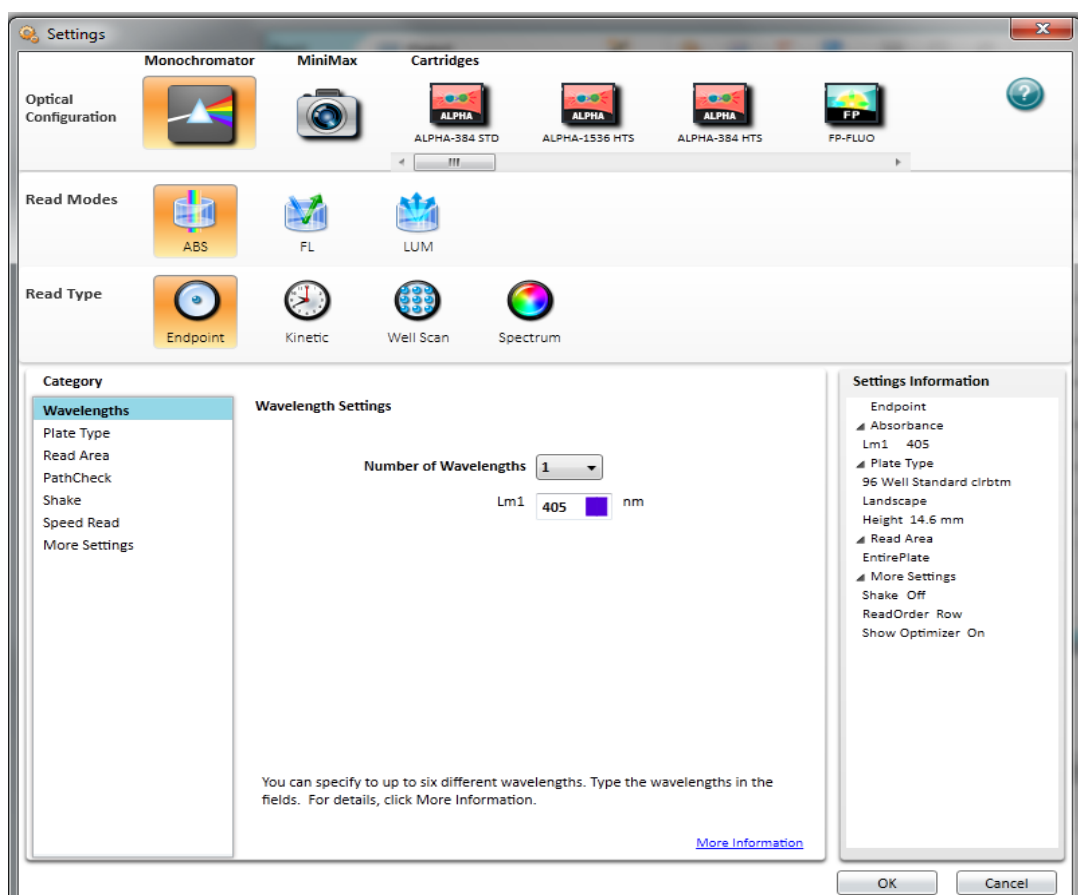


4. 仪器检测参数设定

所有对仪器的参数设定都可以在'Settings'中完成。



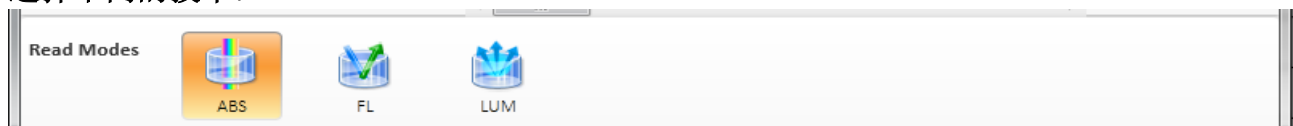
按'Settings'键后出现如下对话框:



然后选择光栅或 MiniMax 成像或各种不同的卡盒（软件自动检测机器内已安装的卡盒）







选择不同的技术:



不同的读数模式:



在上图中分别代表:

-  → **终点法检测**，即获得在单一时间点的样品检测值。
-  → **动力学法检测**，即获得在预先设定的时间段中样品在不同时间点的检测值。
-  → **波长扫描检测**，即获得样品在连续多个波长处的检测值。
-  → **单孔多点检测**，即获得每孔样品在多个位置进行检测并且平均后的检测值。

四光栅具有三种功能：**ABS\FL\LUMI**，不同的卡盒具有不同的功能：（卡盒的安装：根据卡盒上的安装位置标示，卡盒安装于上层），MiniMax 具有成像功能

ABS: 光吸收

FL: 荧光

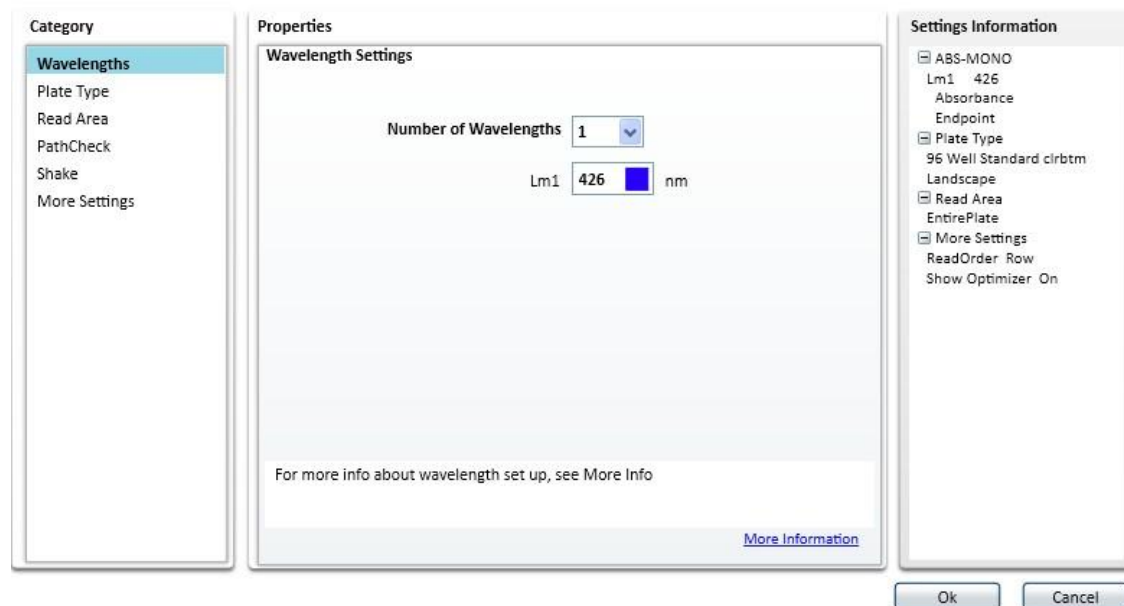
LUM: 化学发光

HTRF: 均相时间分辨荧光

FP: 荧光偏振

AlphaScreen

根据用户所需要获得的结果类型选择合适的检测功能和检测类型，并在指标栏(如下左图)中选择对应的参数设定。全部设定完成后按界面右下角的 **OK**，如果需要取消则按 **Cancel**。



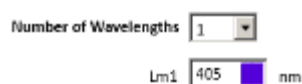
1. 终点法检测

1) Read Mode

可选择 Fluorescence(荧光强度), Absorbance(光吸收), Luminescence(化学发光), Time Resolved(时间分辨荧光), Fluorescence Polarization(荧光偏振)五种读板模式。不同的卡盒会显示不同的功能，根据实验选择其一。

根据样品不同，选择 Top read(顶读)，适用于均相溶液和悬浮细胞的检测；Bottom Read(底读)读板方式，适用于贴壁细胞的检测。

2) Wavelengths



处可以选择检测几种波长，光吸收模式最多为 6 种，其他模式均为 4 种。

- 对于光吸收模式，可以在 Lm1 后面的框中填入检测所用波长。
- 对于荧光强度，时间分辨荧光和荧光偏振模式，可以在 2 个框中分别填入激发波长和发射波长。
- 对于化学发光模式，一般使用 'All'。当同时检测不止一色化学发光的时候可填入相应的检测波长。

3) Plate Type

对于不同实验可以选择 6-1536 孔板及其具体的板型。根据微孔板的厂家型号，在下拉表中做相应选择。选择原则见**硬件操作步骤及注意事项**。

4) Read Area

可用鼠标先选中起始孔按住不放，进行拖曳值选中微孔板上所有需要检测的孔。

5) PathCheck

仅用于光吸收模式，即将微孔板检测得到的原始光吸收值通过参比校正到 1cm 光径长度时的光吸收值。可选择 'Water Constant' (以水做参比)。

6) Shake

选中 Shake 后可以选择读板之前震板，可选择 0-999 秒。可选择不同的震板强度和震板模式。

7) More settings: read order

Row: 按行读

Column: 按列读

Well: 按孔读

2. 动力学法检测

Timing

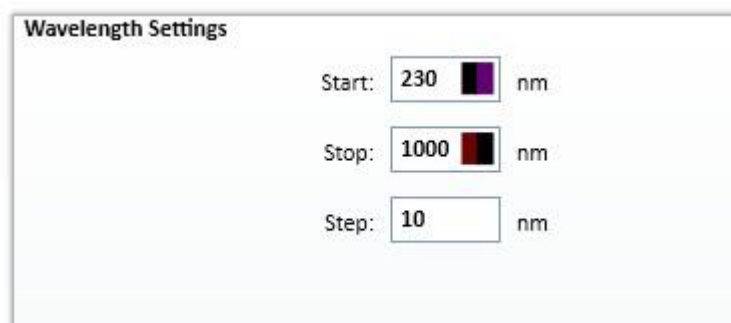
与终点法相比，动力学法的设定只是在左边版面多了时间的设定。选择 Timing 后可以看到右侧参数设定中包含有 'Total Run time' 即整个检测反应时间；'Interval' 即各检测点之间的时间间隔。鼠标点中这两个相应的数字框后可以进行时间的修改。如果时间间隔太短，会出现警报。最小的间隔时间取决于一次微孔板检测中同时检测多少个孔。



3. 波长扫描检测

与终点法相比，'wavelength'的设定有所区别。

1) 光吸收检测和化学发光检测



在'start' 和'stop' 的框中分别填入起始检测波长和终止检测波长。在'step' 的框中填入检测点之间的步径，最小为 1nm 步径。

2) 荧光强度检测

分为两种：

- a) 固定激发波长(Excitation)扫描发射波长(Emission)

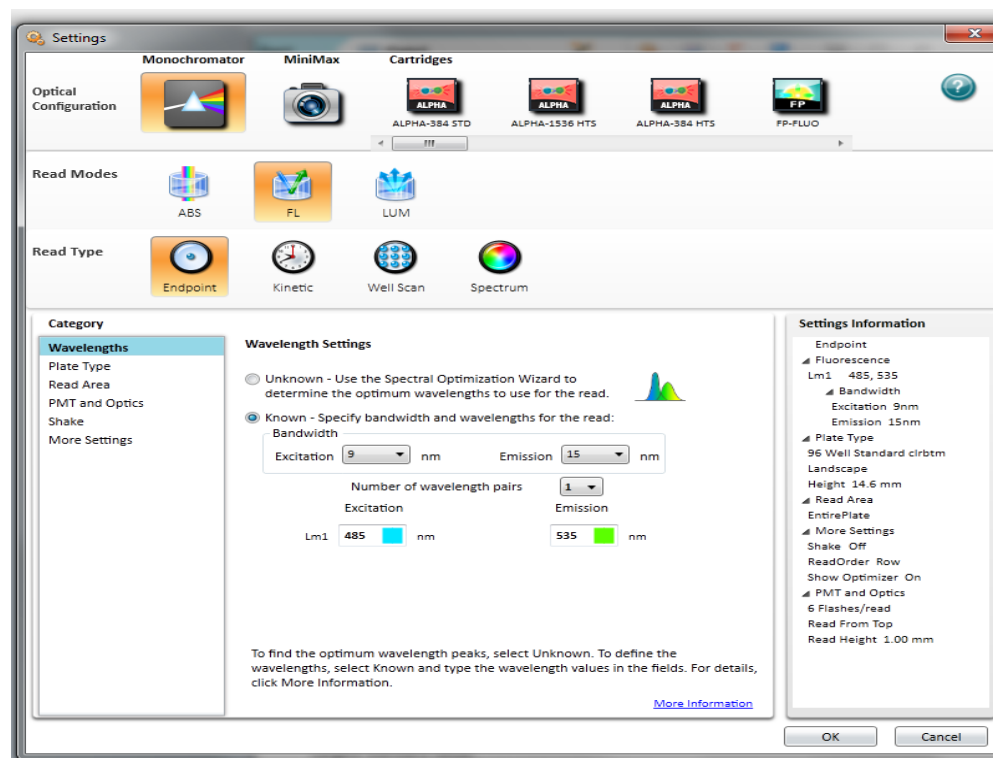
起始发射波长必须比固定激发波长要大。

- b) 固定发射波长(Emission)扫描激发波长(Excitation)

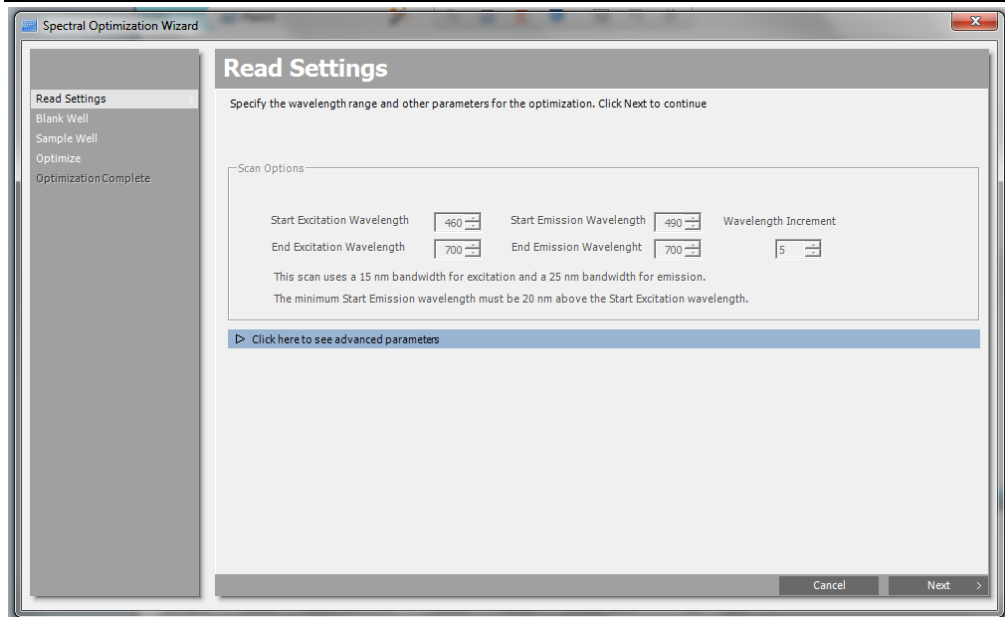
终止激发波长必须比固定发射波长要小。

在各框中分别填入固定的波长，扫描的起始/终止波长，扫描步径。

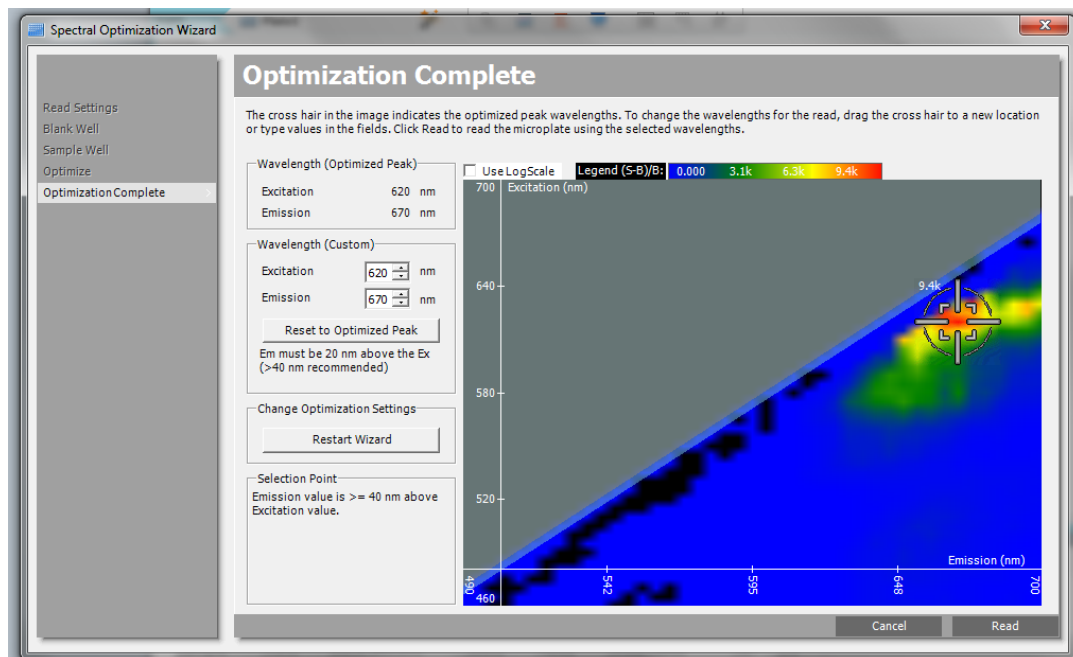
I3 还提供一种激发和发射同时扫描的功能：选择下图的 Unknown 方式，确定，然后直接 read



会出现如下提示：



然后直接设置激发和发射扫描的波长范围即可，然后点击 Next，选择一个 Blank 孔，再 Next 选择一个 sample 孔，next 即可，机器自动扫描后会给出下图：

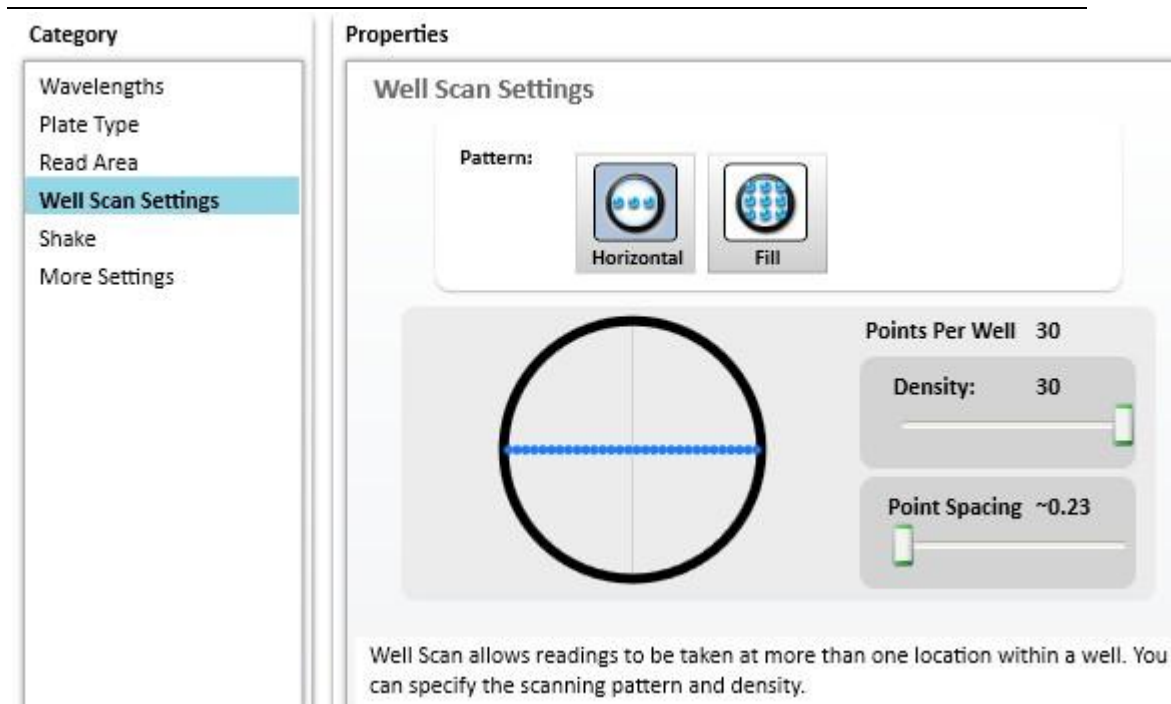


十字星位置为最佳的激发和发射组合，波长显示在左边。

4. 单孔多点检测

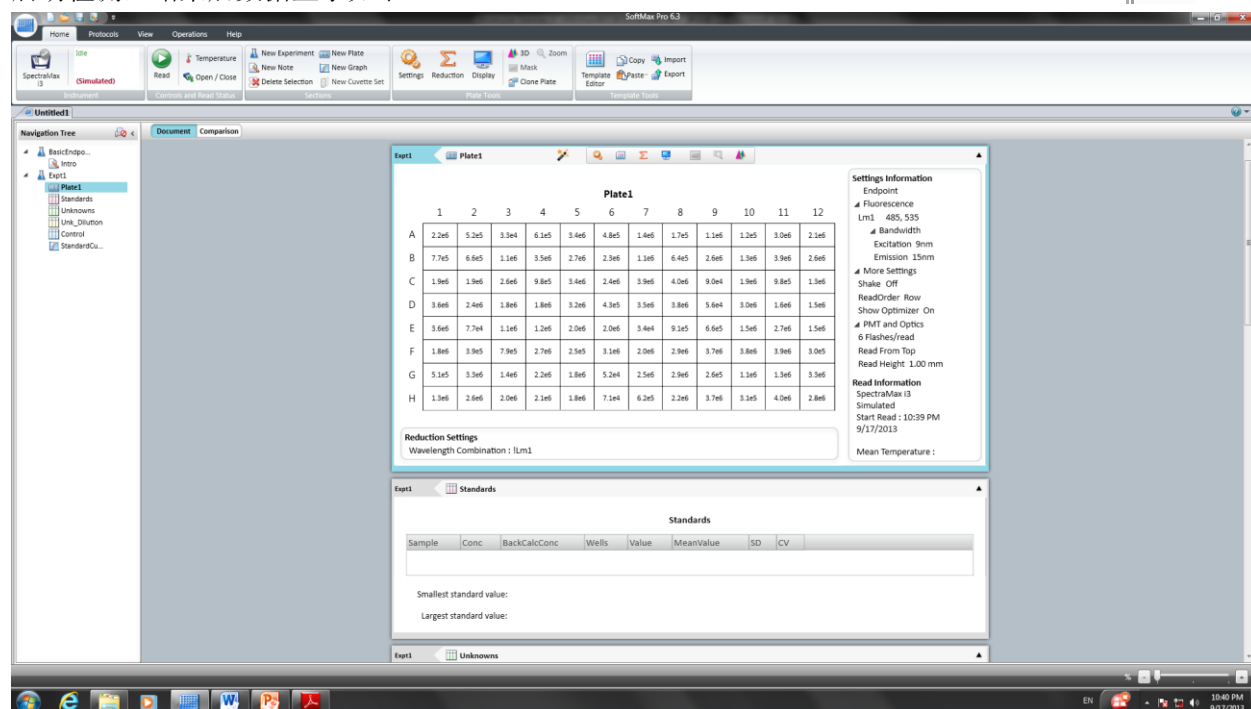
Well Scan Editor

与终点法检测相比，左栏多了孔内检测密度的设定。选中后出现右栏，如下图：



在'Pattern'下，根据实验需要选择每孔检测横向 3 个点，纵向 3 个点，5 个点和 9 个点。随着点数增加总检测时间增加。

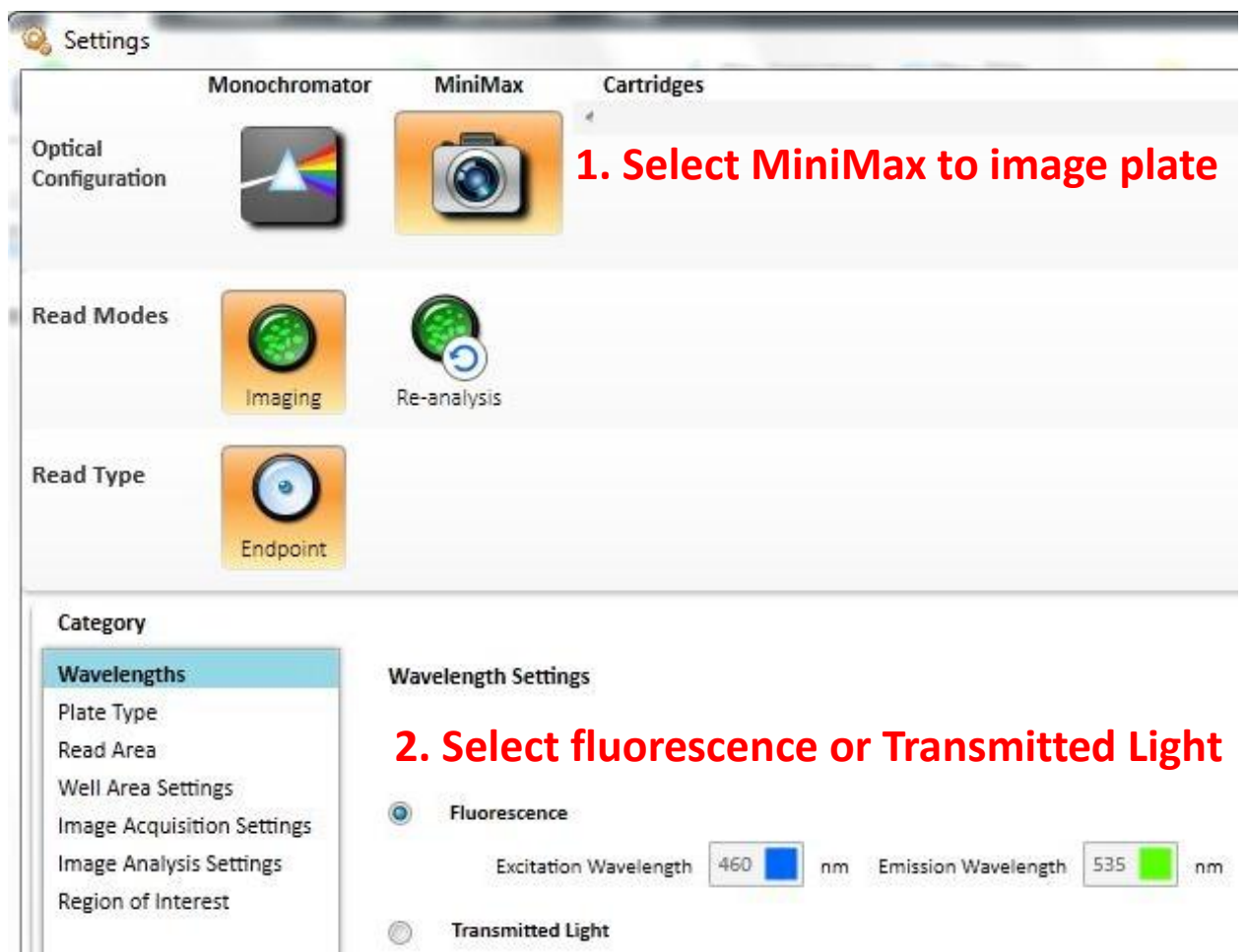
全部设定完后按对话框右下角的'OK'确认，回到文档界面。放入检测板，按图标栏的启动检测，结束后数据显示如下：



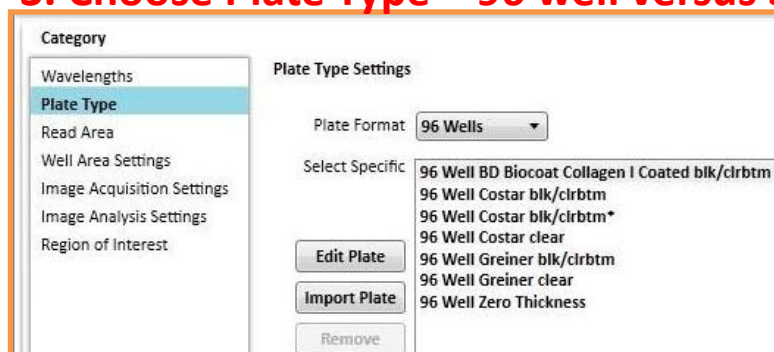
注意！本操作简介中所有实验数据由模拟器获得，该结果与实际仪器

检测结果无关，仅仅用于说明。

MiniMax 成像设置步骤:



3. Choose Plate Type – 96 well versus 384 well



4. Select Area of Plate to Image

Category

- Wavelengths
- Plate Type
- Read Area**
- Well Area Settings
- Image Acquisition Settings
- Image Analysis Settings
- Region of Interest

Read Area Settings

384 Well BD Biocoat Collagen I Coated blk/clrbtm ☒ Select All

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A																								
B																								
C																								
D																								
E																								
F																								
G																								
H																								
I																								
J																								
K																								
L																								
M																								
N																								
O																								
P																								

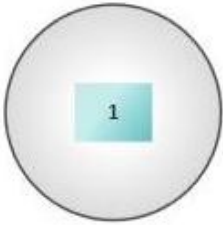
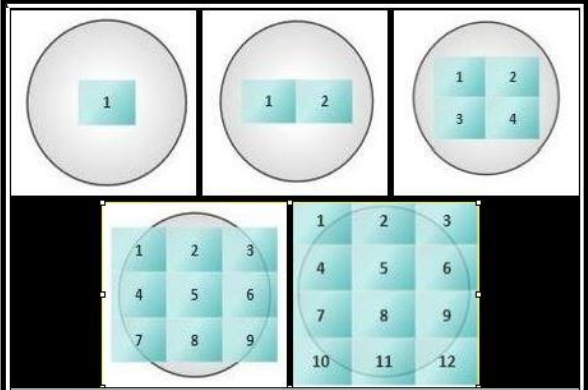
5. Select the Number of Images Per Well

Category

- Wavelengths
- Plate Type
- Read Area
- Well Area Settings**
- Image Acquisition Settings
- Image Analysis Settings
- Region of Interest

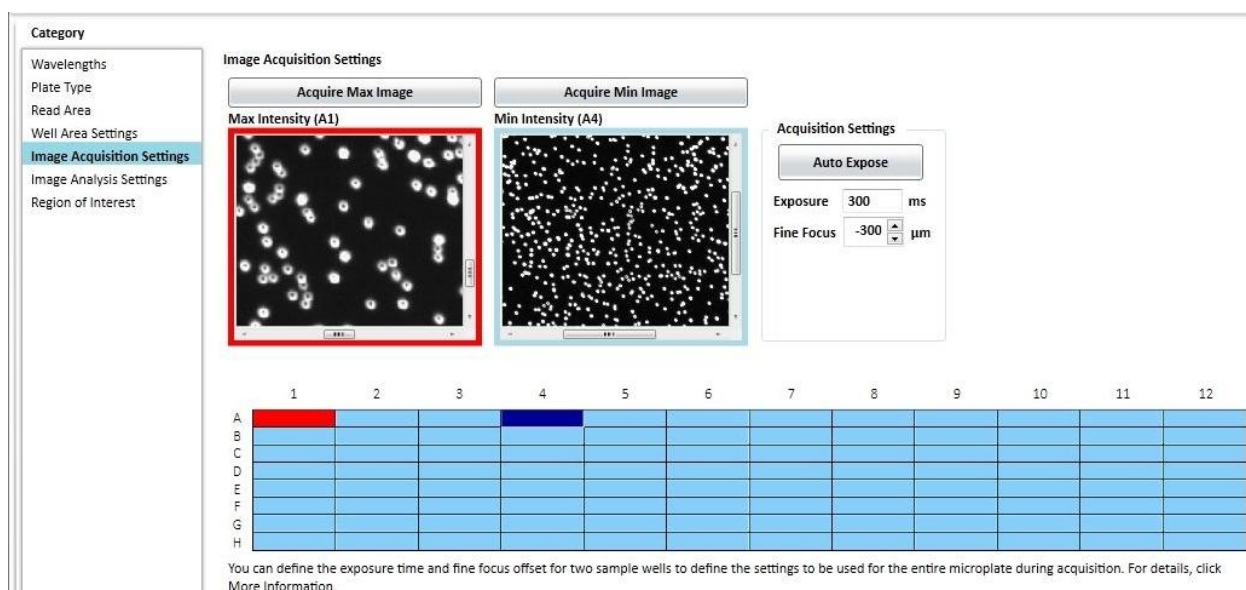
Well Area Settings

☒ 1 Site
☐ 2 Sites
☐ 4 Sites
☐ 9 Sites
☐ 12 Sites

6. 选择曝光时间和焦距

- 选择信号最强和最弱孔，自动给出最佳曝光时间；
- 用户可以微调焦距。



7. 设置分析参数

- 选择分析类型：细胞计数、增值、蛋白表达等
- 选择数据输出参数

Category

- Wavelengths
- Plate Type
- Read Area
- Well Area Settings
- Image Acquisition Settings
- Image Analysis Settings**
- Region of Interest

Analysis Types

Cell Count

Analysis Settings

Analyze

Local Intensity Threshold 100

Minimum Object Width 4 μm

Maximum Object Width 20 μm

Set Range by Clicking on Objects

Output Parameters

- ☒ Cell Count
- ☐ Covered Area
- ☐ Average Area
- ☐ Average Intensity
- ☐ Expression in Image

Max Intensity

Min Intensity

Output Parameters

Output Data

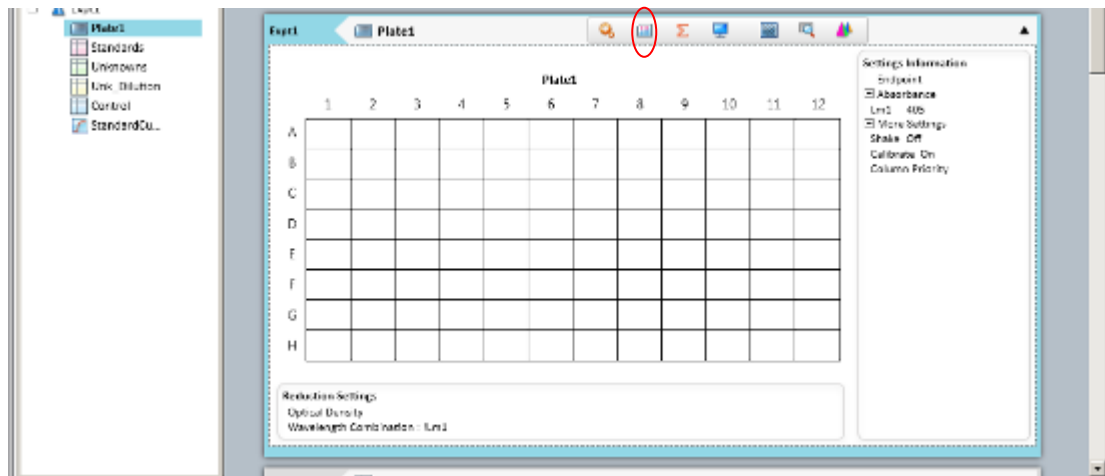
A combination of intensity threshold and object size can be used to find the cells for your analysis. For details, click [More Information](#).

检测样品分组设定（可以先设置模板分组，也可以先读数再设置模板分组。

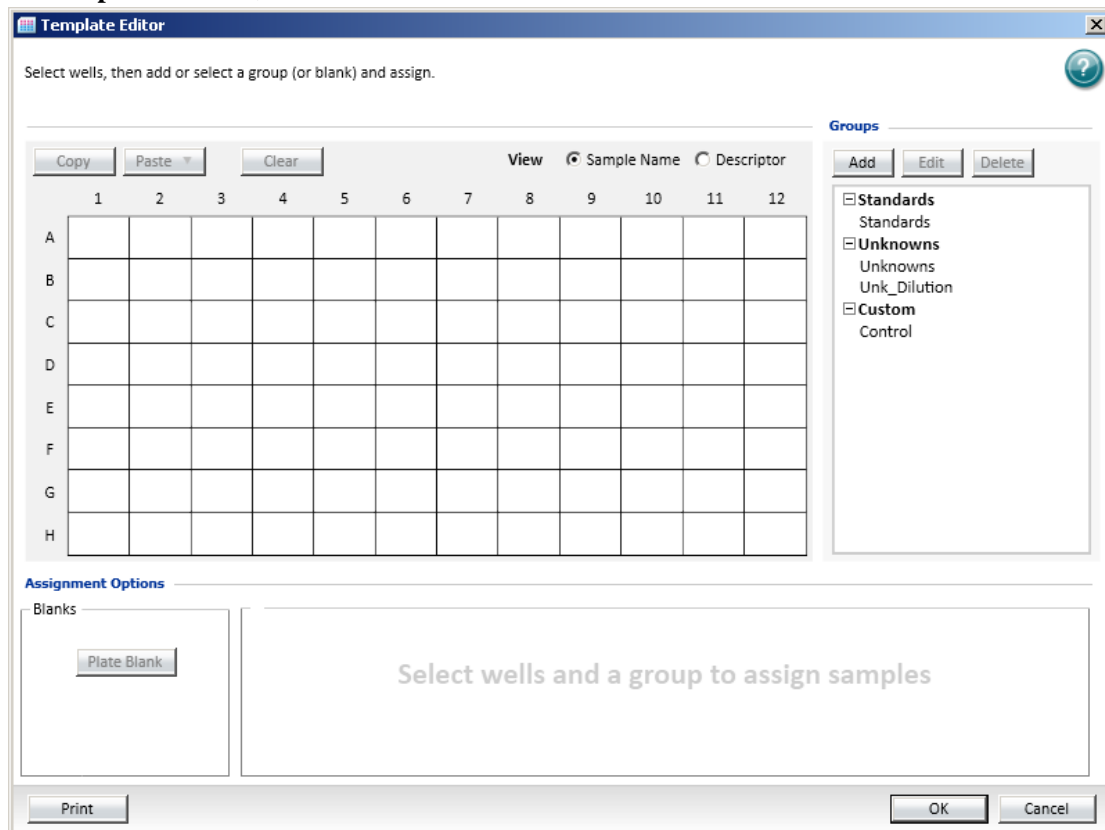
设置样品分组，可以让软件对实验数据进行自动统计处理。保存为 spr 格式后，

设置的模板既可以保存，以后打开可以直接使用，不用再做过多设置。）

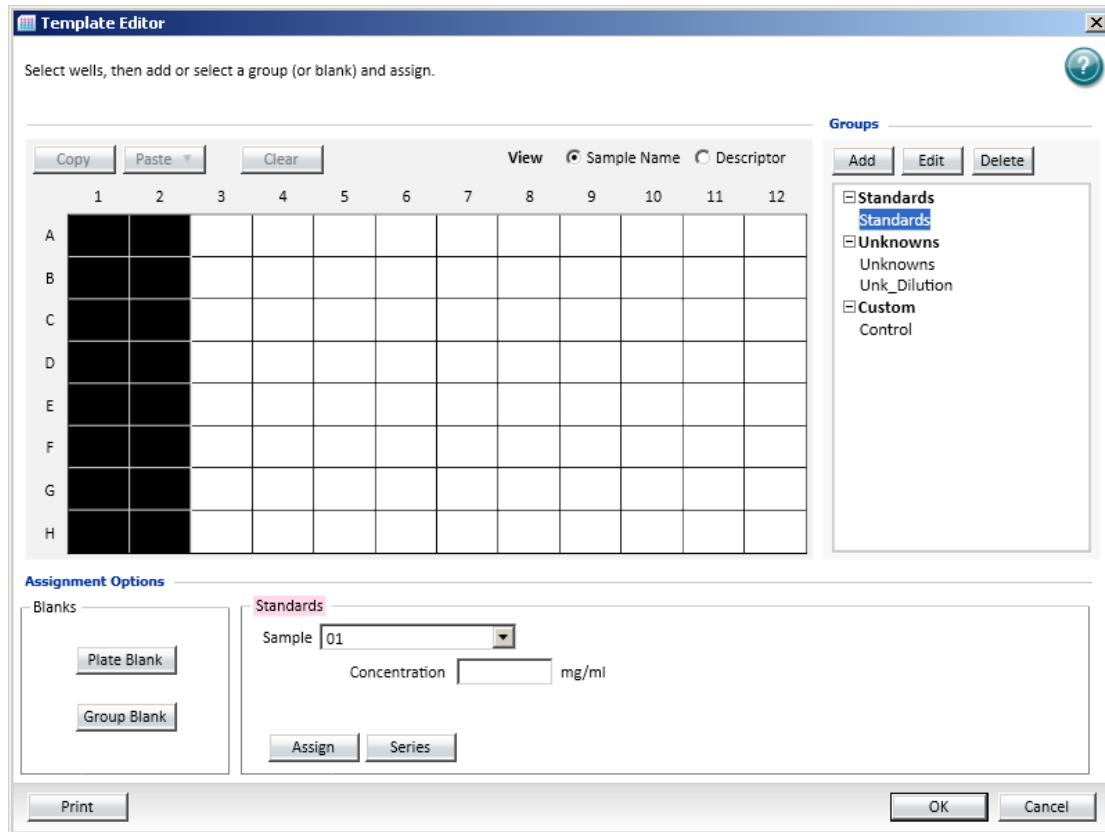
所有对样品的分组设定都可以在**'Template'**中完成。



按**'Template'**键后出现如下对话框：



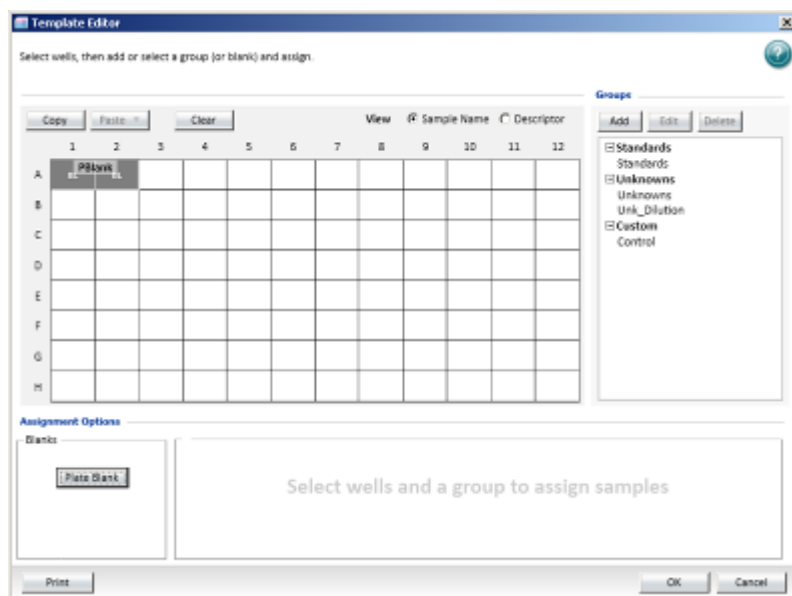
先用鼠标点中并拖曳，选中要进行编辑的孔，被选中的空会变黑，然后点击 Groups 栏中的下拉菜单选择所要进行的分组，例如 标准品组 standards，样品组 未知样品 unknowns 和未知稀释样品 Unk_Dilution，对照样品组 Control。



具体设定步骤如下例：

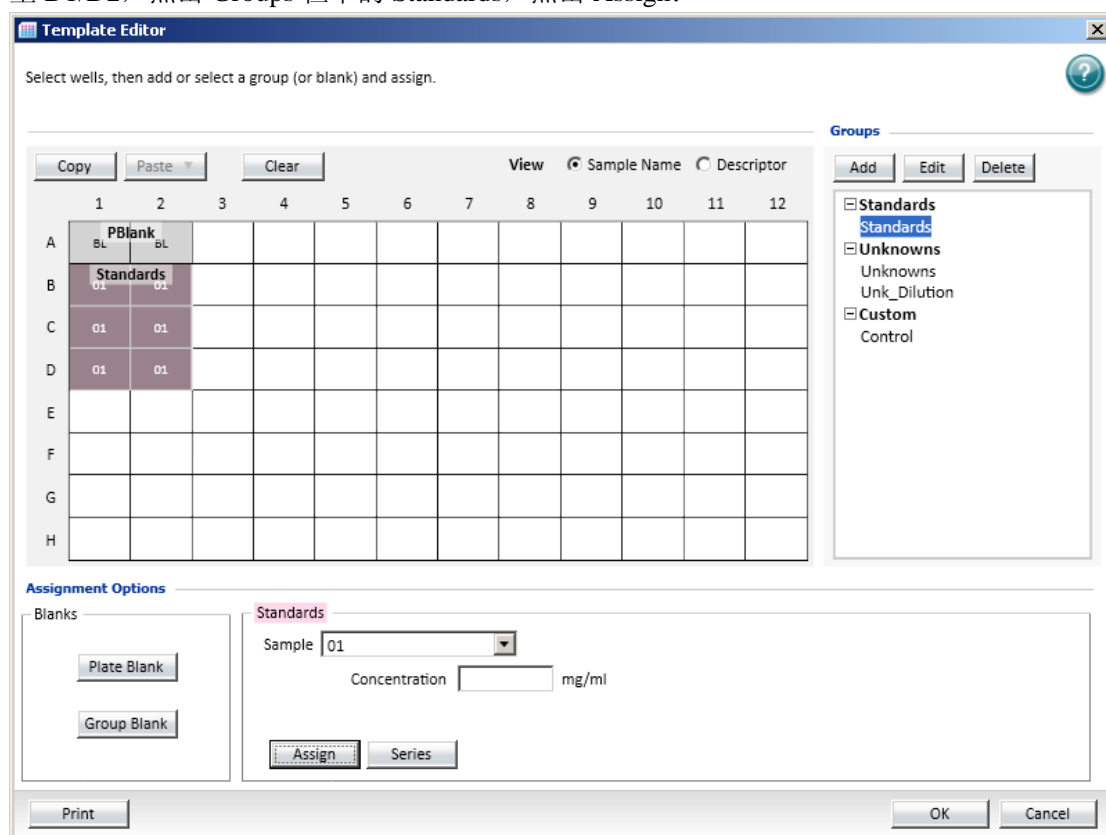
1. 设定本底参照(BLANK)

点击 template 进入上述界面，选中所用微孔 A1 & A2，点击 Blanks 栏中的中的 Plate Blank 按钮选中 blank。结果如图 则其他的数据结果均显示为扣除本底(A1&A2 平均值)的结果。

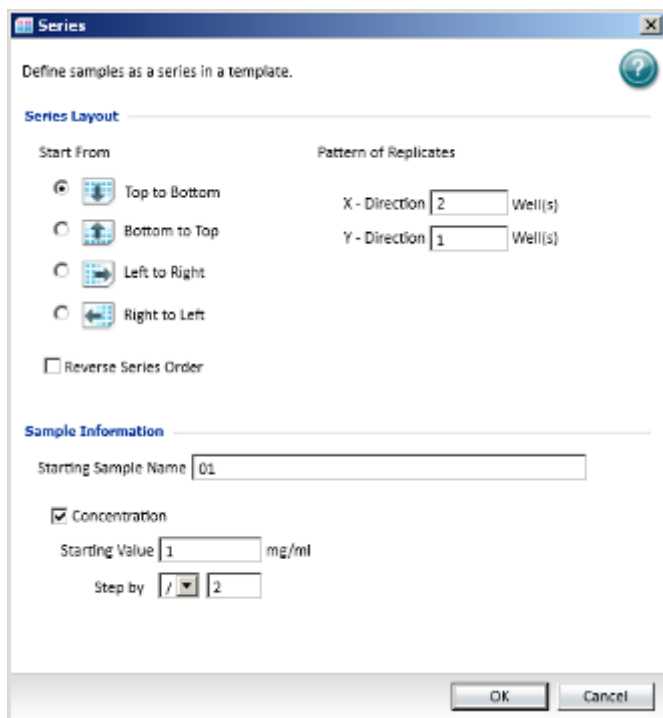


2. 设定标准样品(Standards)及相应的标准曲线

当有一系列已知浓度梯度的样品做为标准样品时, 点击 template 进入编辑界面, 选中微孔 B1/B2 至 D1/D2, 点击 Groups 栏中的 Standards, 点击 Assign:



Standards 组分好后, 然后点击对话框左下角的 **Series**, 进入对话框:

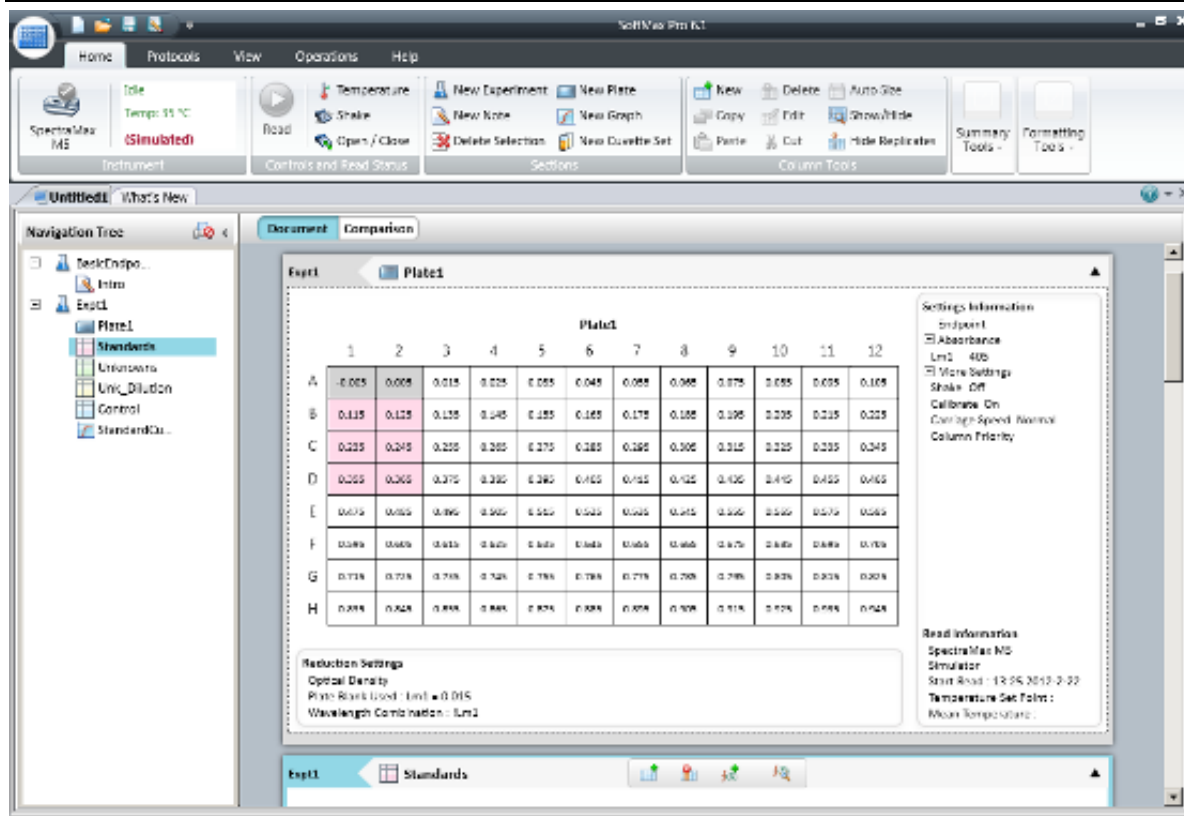


‘Start from’中‘Top’, ‘Bottom’, ‘Left’, ‘Right’表示该组内样品从那个方向起始排列。Pattern of Replicates 表示复孔为几个孔，本例中选‘Top’，复孔 2 个。

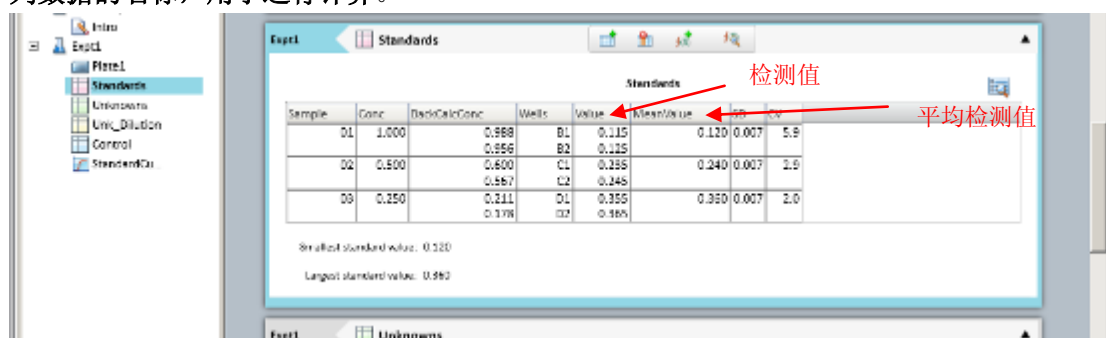
Starting Sample Name 表示起始样品号为 01，以后依次为 02, 03...



在 Concentration 栏内填入适当的浓度，‘Starting value’表示起始样品的浓度，可以在框内填入相应数值。‘Step by’表示以什么方式进行浓度梯度，前面下拉框可以选择‘+’、‘-’、‘*’、‘/’，后面框内可以填入计算的 值，比如起始浓度是 2，增加 2，则选择+，输入 2。

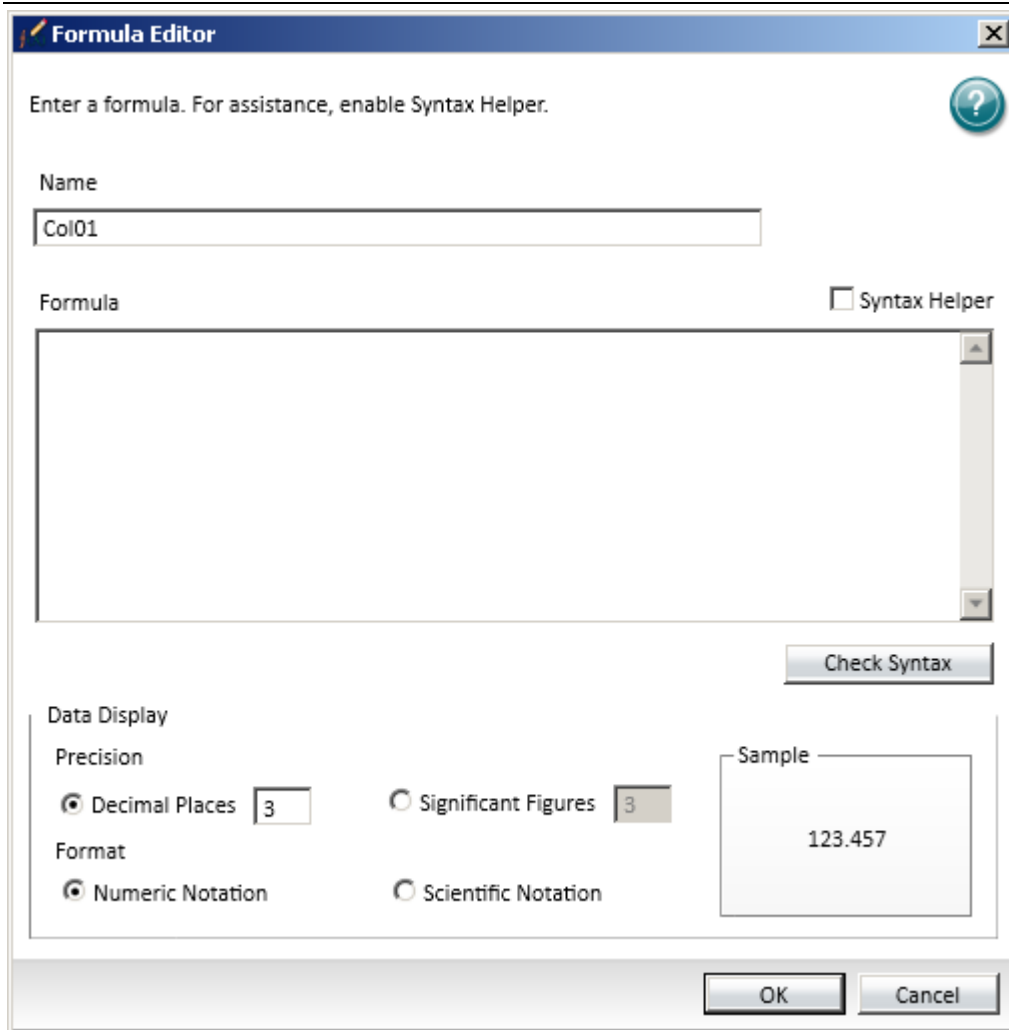
对话框右下角‘OK’确认，回到文档栏如下图。‘Plate’栏中显示出‘blank’和标准样品‘Standards’的扣除了本底的检测光吸收值。



由于添加了标准品组，那么在原有标准样品数据表格内就会出现标准品检测数据，表格第一栏是每列数据的名称，用于运行计算。



在此栏中，按  可以在表格中多加一列，对表格中每个样品进行计算。点击  进入如下界面：



Formula Editor

Enter a formula. For assistance, enable Syntax Helper.

Name:

Formula:

☐ Syntax Helper

Data Display

Precision

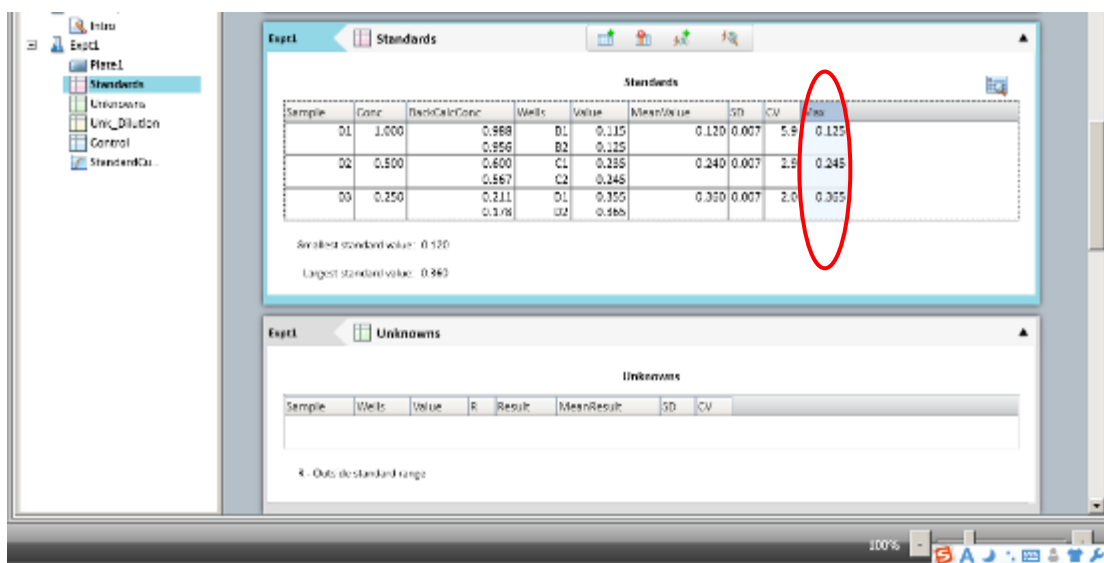
☒ Decimal Places ☐ Significant Figures

Format

☒ Numeric Notation ☐ Scientific Notation

Sample:

‘Name’中填入该列数据的名称，即计算中所引用的名字。‘Formula’中填入该列数据所应用的公式。比如要得到每个样品复孔里检测值中最大的那个，可以在‘name’中填入 **Max**，‘Formula’中填入 **Max(Value)**。按对话框右下角‘OK’确认，回到‘Standards’栏，如图：




Standards

Sample	Conc	Blank/Calc Conc	Wells	Value	Mean/Value	SD	CV	Area
D1	1.000	0.988	D1	0.115	0.120	0.007	5.9	0.125
		0.956	B2	0.125				
D2	0.500	0.600	C1	0.235	0.240	0.007	2.9	0.245
		0.667	C2	0.245				
D3	0.250	0.211	D1	0.355	0.360	0.007	2.0	0.365
		0.278	D2	0.465				

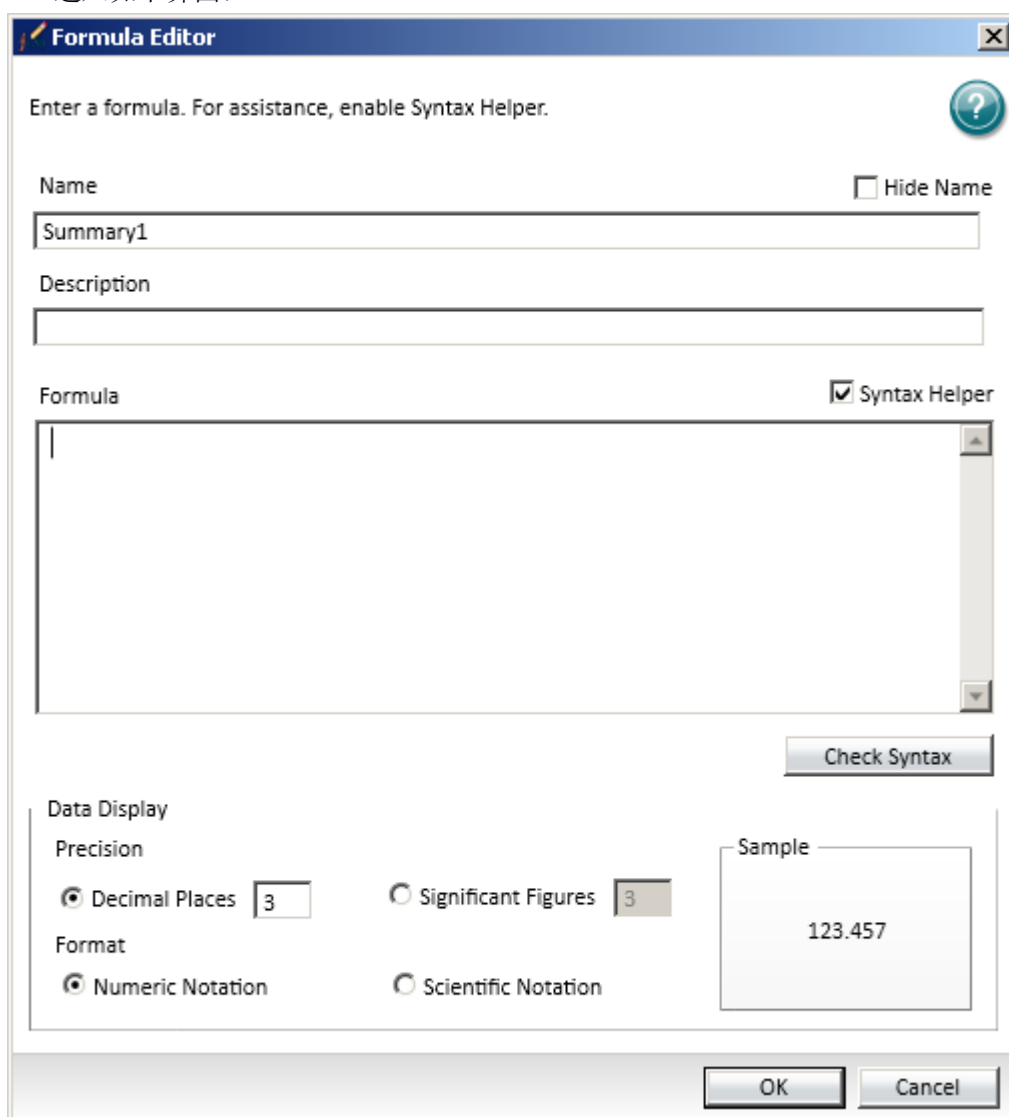
Smallest standard value: 0.120
Largest standard value: 0.940

Unknowns

Sample	Wells	Value	R	Result	Mean/Result	SD	CV
4 - Out of standard range							

在此栏中，按  可以在表格底下多加一条分析结果，对表格中样品进行总结性的计算。点击

进入如下界面:



Formula Editor

Enter a formula. For assistance, enable Syntax Helper.

Name: ☐ Hide Name

Description:

Formula: ☒ Syntax Helper

Data Display

Precision

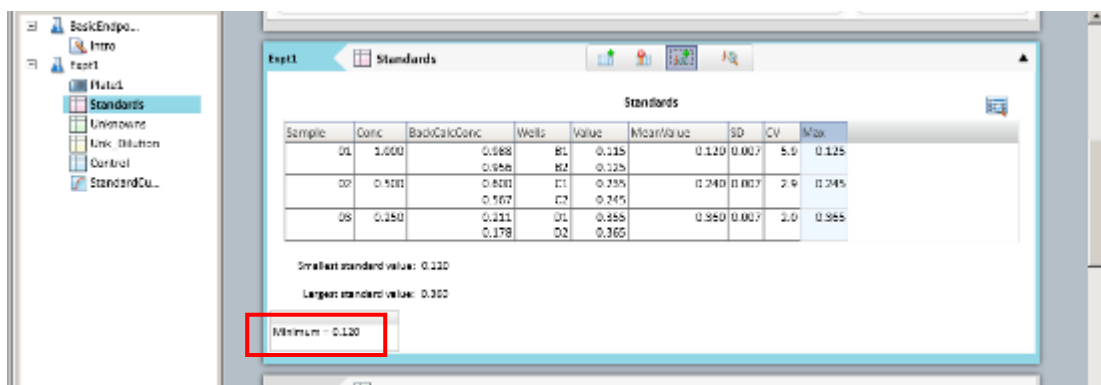
☒ Decimal Places ☐ Significant Figures

Format

☒ Numeric Notation ☐ Scientific Notation

Sample:

‘Name’中填入该总结的名称，即计算中所引用的名字。可以选择显示与否‘Hide Name’。‘Description’中填入对该总结的描述。‘Formula’中填入该总结所应用的公式。比如要得到该组数据中所有样品的平均检测值中最小的值，名称可填为‘Minimum’，‘Formula’写为 **Min(MeanValue)**。对话框右下角‘OK’确认。转到如下栏:



Sample	Conc	BackCalcConc	Wells	Value	Mean/Value	SD	CV	Max
D1	1.000	0.988	B1	0.115	0.120	0.007	5.0	0.125
		0.956	B2	0.125				
D2	0.500	0.500	D1	0.235	0.240	0.007	2.9	0.245
		0.507	D2	0.245				
D3	0.150	0.131	D1	0.355	0.350	0.007	2.0	0.355
		0.178	D2	0.365				

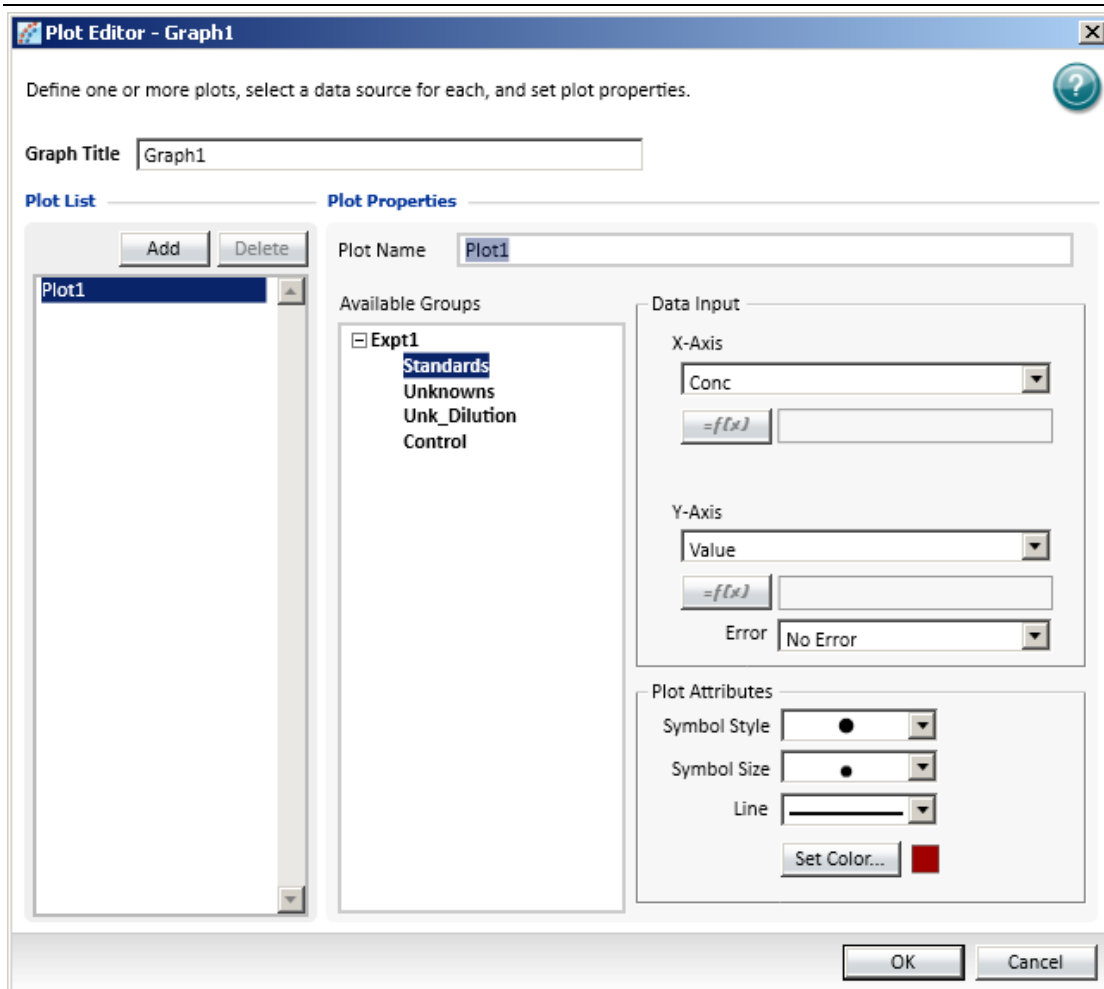
Smallest standard value: 0.120

Largest standard value: 0.360

Minimum: 0.120

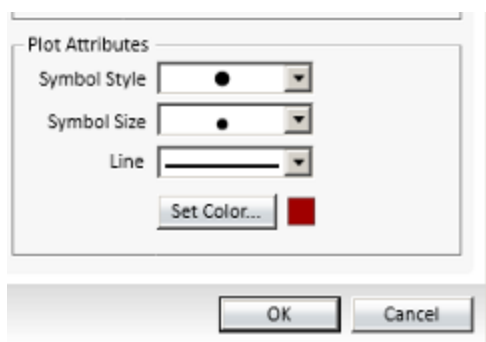
通过该方法可以对同一组数据进行数据计算和结果分析。

要对该组数据作图，可以在软件界面上方的菜单中的‘New Graph...’:

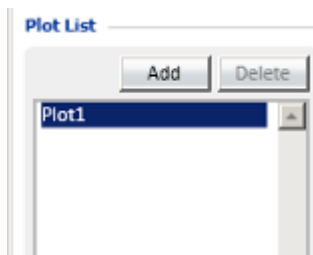


‘Title’内填入该图的名称，一张图中可以有多个曲线。‘Type’中选择点散图(Scatter)或柱状图(Cluster/Stack bar)。本例中使用点散图。

在该对话框中，‘Plot Name’中填入该条曲线的名称，即以后在数据计算中要引用的名字。‘Source’中选择所使用的原数据，该例中为 Experiment 中的 Standards。在 X-axis 和 Y-axis 中可以通过下拉栏选择该曲线横坐标和纵坐标所用的数据，该例中选择 Concentration 和 MeanValue。



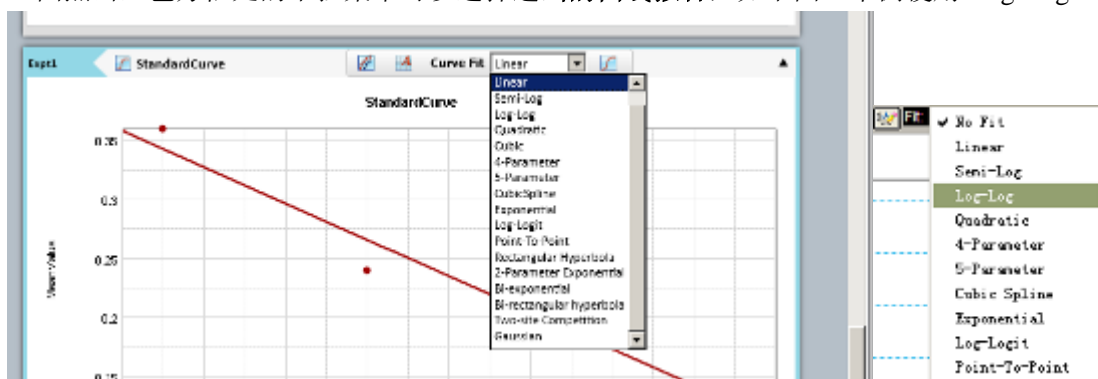
用于选择图中每个点的形状和颜色。



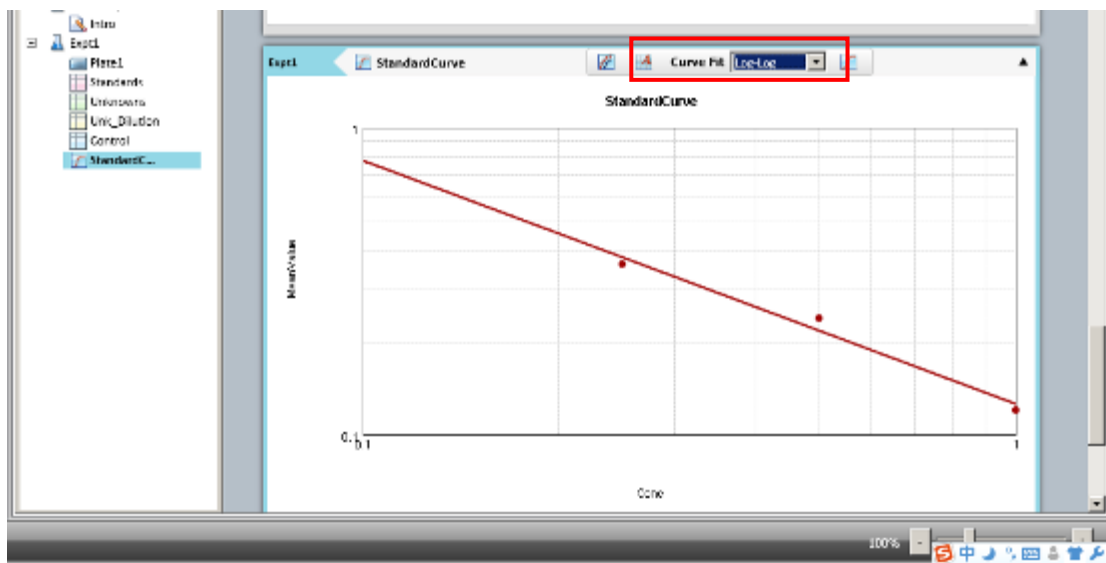
表示该图中有哪几条曲线，可以按'Add...'在该图中增加曲线，按'Edit'对该曲线进行修改，按'Delete'删除该曲线。本例中仅为一条曲线。对话框右下角'OK'确认转入：



上图点击红色方框处的下拉菜单可以选择适当的曲线拟合，如下图。本例使用'Log-Log'。



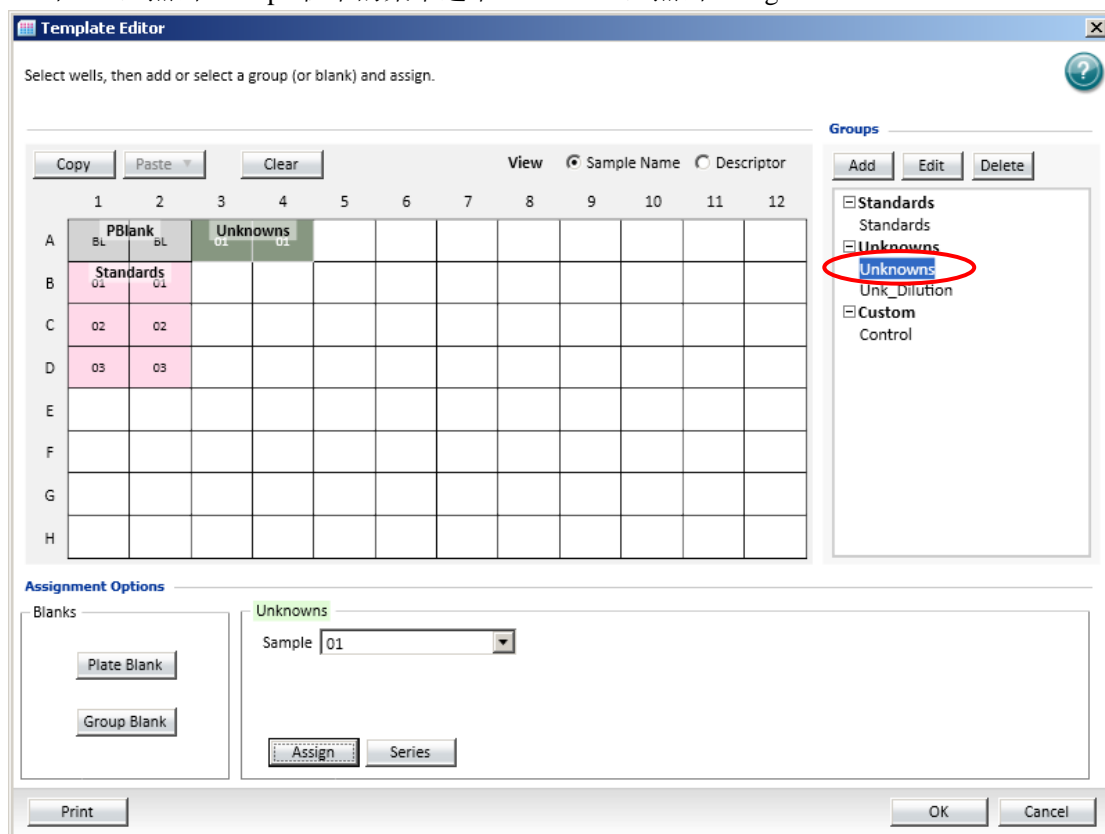
选择后曲线图如下：



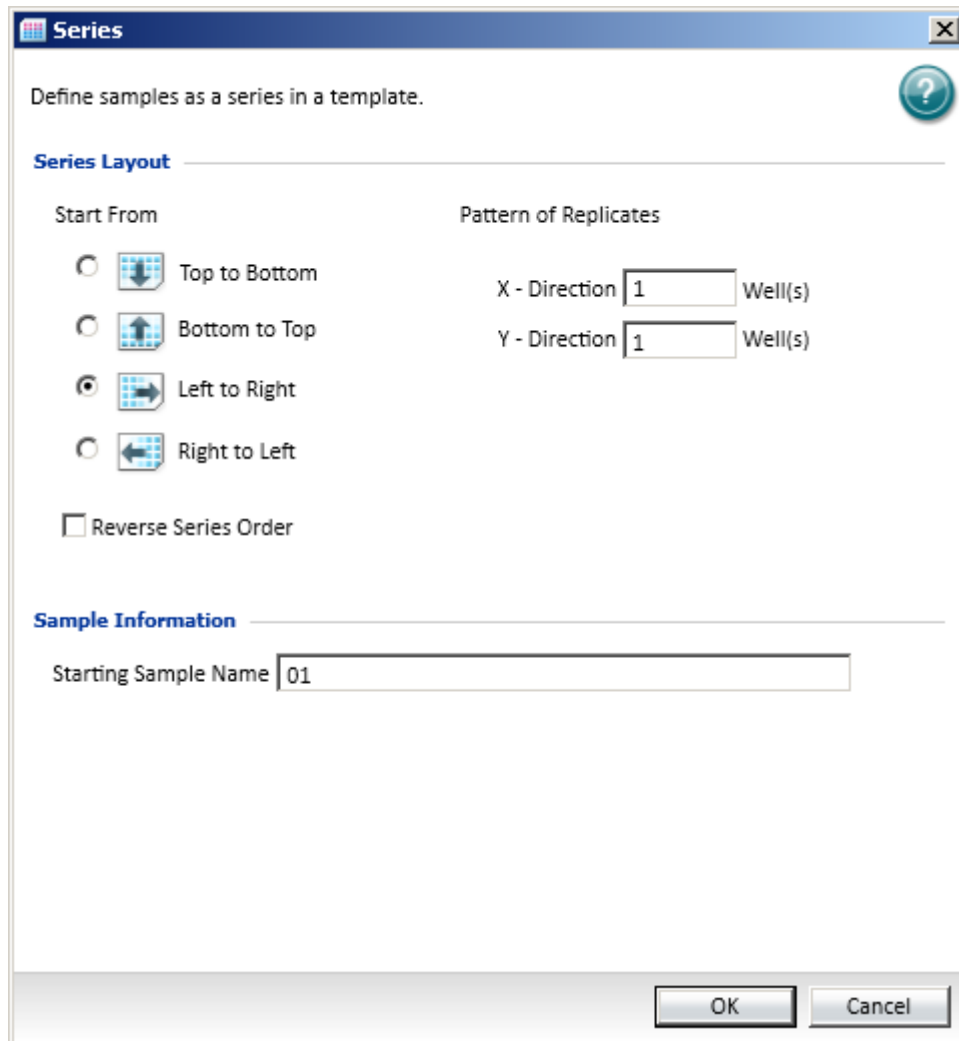
软件自动根据所选用的拟合方式，做出曲线图以及相应的曲线拟合数学公式中的参数。

3. 设定未知样品(Unknowns)并根据标准样品计算相应的浓度

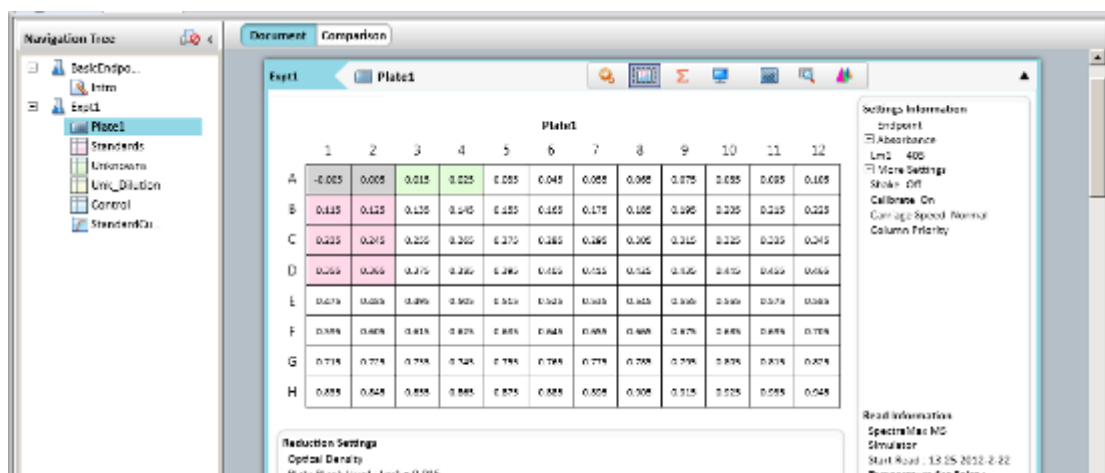
当有一系列未知浓度的样品在微孔板中被检测时，点击 **template** 进入编辑界面，选中微孔 A3 和 A4，点击 Groups 栏中的菜单选中 Unknowns，点击 Assign:



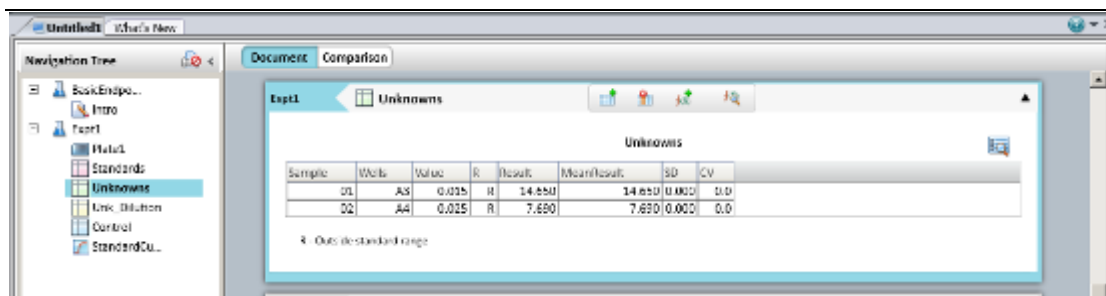
同样点击'Series',可看到:



选择从左往右排列, pattern of replicates 设置为 1, 点击 OK, 可看到



并在 Unknowns 分组内对数据做了分组:



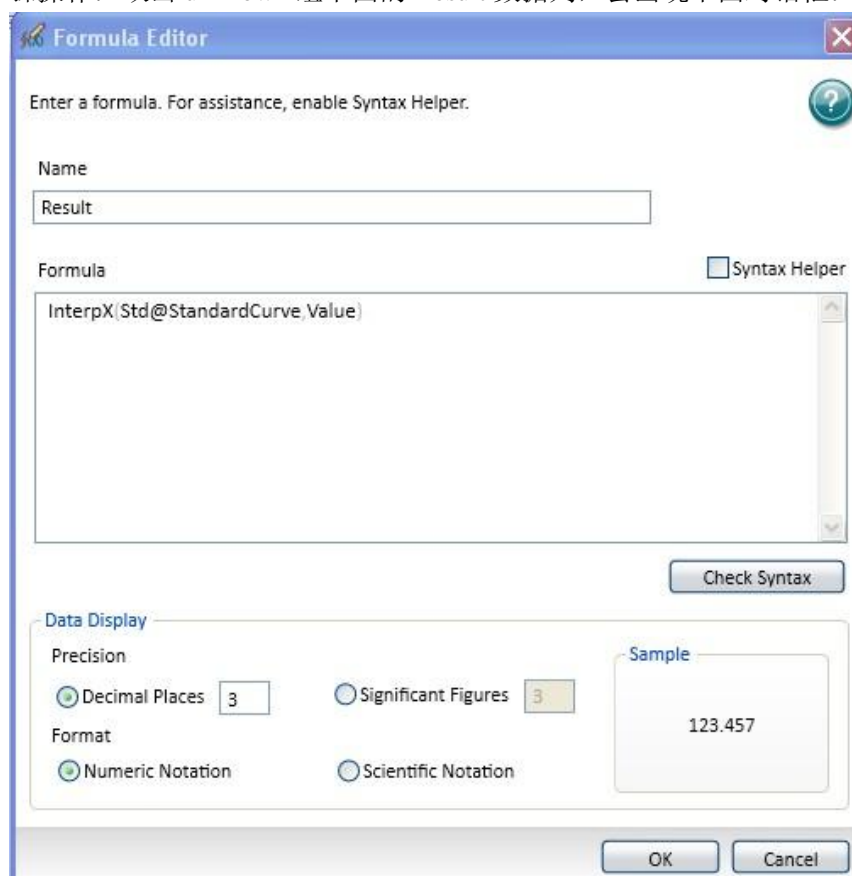
The screenshot shows a software window titled 'Unknowns' with a table of data. The table has columns: Sample, Wells, Value, R, Result, Mean/Result, SD, and CV. There are two rows of data, both with 'R' in the R column, indicating they are out of the standard range.

Sample	Wells	Value	R	Result	Mean/Result	SD	CV
01	A3	0.025	R	14.850	14.850	0.000	0.0
02	A4	0.025	R	7.690	7.690	0.000	0.0

Below the table, it says: **R** Out of standard range

在该表格中，'Values'表示检测值，'Result'表示根据标准曲线带入检测值所得到的浓度。出现'Range?'表示超出曲线范围。

如果引用的标准曲线名称不对，则计算结果也会出错。更改需要引用的曲线可以按下面步骤操作：双击 unknown 组下面的 Result 数据列，会出现下面对话框：



The screenshot shows the 'Formula Editor' dialog box. It has a 'Name' field containing 'Result'. The 'Formula' field contains 'InterpX(Std@StandardCurve,Value)'. There is a 'Check Syntax' button. Below the formula field, there are 'Data Display' options: 'Precision' (Decimal Places: 3, Significant Figures: 3) and 'Format' (Numeric Notation, Scientific Notation). A 'Sample' preview box shows the value '123.457'. At the bottom are 'OK' and 'Cancel' buttons.

这个时候可以在 Formula 下面编辑公式：interpx (Std@StandardCurve,Value)

公式的意思是：把 Unknown 的 Value 值带入 StandardCurve 组下面的 Std 标准曲线里，计算 X 的值。这里需要修改的就是曲线的名字：如果曲线名字是 plot1，这个曲线位于 Graph1 下面。则相应的公式则是：interpx (plot1@Graph1,Value)

所有的公式名称，引用方法请参见《Formula Reference Guide》。