PROTOCOLO DE UTILIZACIÓN DEL LECTOR DE PLACAS FLUOstar

<u>ÍNDICE</u>

- 1. OBJETO
- 2. ALCANCE
- 3. REFERENCIAS
- 4. GENERAL
 - Descripción del equipo.
 - i. Filtros
 - ii. Óptica combinada

5. MANEJO DEL EQUIPO

- Encendido del equipo.
- Mediciones
 - Protocolo "Quick start"
 - Medición utilizando protocolos pre-definidos
 - > Definición de protocolos.
- Análisis de resultados

6. ANEXOS

- ANEXO I: Exportar resultados.

OBJETO

Este procedimiento tiene por objeto la descripción de las operaciones necesarias para la utilización del lector de placas multimodo FLUOstar Omega.

ALCANCE

El procedimiento descrito se aplica para la realización de experimentos con los siguientes modos de lectura: intensidad de fluorescencia y medición de absorbancia mediante filtros.

REFERENCIAS

- Omega series operating manual. BMG Labtech.
- MARS Data Analysis Software manual.

GENERAL

Descripción del equipo:

FLUOstar Omega es un lector de microplacas que puede equiparse con varios modos de detección:

- Absorbancia UV/vis: con detección basada en espectrómetro o en filtro.
- Intensidad de fluorescencia (incluyendo FRET y TRF).
- Luminiscencia (incluyendo BRET).



Nota: Actualmente, el equipo solo puede utilizarse para medir fluorescencia y absorbancia basada en filtro.

<u>Filtros</u>

Dispone de 4 filtros de excitación y 4 de emisión instalados de fábrica. (La selección de filtros varía con configuración del instrumento). La posición de los filtros instalados, está recogida en la tabla de filtros.





Nº	Excitation	Emission
1	280-10	320-10
2	290-10	380-10
3	450-10	510-10
4	480-10	520-P
5	600-10	480-10
6		450-10
7	Em405	
8	355-10	EMPTY

Óptica Combinada

La óptica combinada se compone de dos guías de luz para intensidad de fluorescencia o luminiscencia y una fibra de cuarzo para absorbancia.

- Para mediciones de fluorescencia: la excitación entra a través de la guía de luz marcada en amarillo y la emisión se mide a través de la guía de luz marcada en azul.
- Para mediciones de absorbancia: La guía de luz gris marcada en rojo, excita desde arriba y la absorbancia se mide a través de la óptica inferior.



MANEJO DEL EQUIPO

- Encendido:

Nota: Se recomienda encender el equipo 10-15 minutos antes de comenzar el experimento para lograr una señal estable. Del mismo modo, apagarlo tras su uso, para evitar que se funda la lámpara.

- Encender el equipo y el ordenador.
- Abrir el software Omega control.

181	9 III 4	Ŧ				Orrege						0.00
Plate Dut M	Start Start excurrent	Quick Start Measure	ant Duration	01	+ Mas	Correction Text Run analte	J ^{°C} Temperature Jour	EELE hatan / Perrit	Prime	Manage Protocols Protocols		Abs fater Bellan
MAST PS	PI WELL SC.	Dverfaxteet	* R) 107-28	The sales.	MICOALE.	T the See	04157P QC.	* ^E	Guerlan	* # mm	BP WITH ING.	
400 1011	Ann Mile Bradford T.	AS Advorc	Cel proviti.	10	mega		ware Version	5.14				
Notet 1	Ton Scret 2	Terperatur.		5000			al Namber 4	15-0003				
				Events	ar de 2007, 2014 (Ber	olaiten /	BMGTLA	атесн				
IMGLE	автесн											

 Iniciar sesión con contraseña o hacer *click* en *Run* para iniciar sesión como usuario.

NOTA IMPORTANTE: NO ACCEDER COMO USUARIO ROOT NI MANIPULAR LOS FILTROS

11			II Dut	D	
User	Password	1	User Path	Hun Unly	1
ADMIN	xcoccecce	2000000000			
INSTALL	**********	meesseem			
TEST	*********	*********			
THOMAS SEIDEL	xeccencer	sousseess			
том	*********				
USER	Receptered	xxxxxxxxxxxx			-
USER2	********			1	
					-
					٠

Nota:

Una luz verde constante significa que el instrumento está encendido. Una luz verde intermitente significa que el instrumento está ocupado (por ejemplo, realizando una medición, entrada/salida de placas, cebado, etc.). Una luz verde (5 parpadeos por segundo) significa que se ha producido un error.



- Mediciones:

Para medir una placa, pueden usarse dos modos de medición:

Protocolo "Quick start":



La función "inicio rápido" puede utilizarse para medir una placa sin definir un protocolo de ensayo. Utilizando esta función, siempre se mide la placa completa, como un ensayo de punto final.

Después de hacer *click* en el icono "inicio rápido" aparecerá el siguiente cuadro de diálogo:

1	T 1 T	1
El top	FI bottom LUM top LUM bottom	ABS
Egcitation filter:	485 • Emission filter. 52	20 -
Microplate:	SBS STANDARD 96	•
Plate [D:		•
	Stat massurement Cancel	Help

Seleccionar el método de medición haciendo *click* en el icono correspondiente. (Sólo pueden seleccionarse los que están implementados en el equipo)

La selección de los filtros de excitación y emisión, así como el tipo de microplaca que se va a utilizar, se almacenan de manera independiente para cada método.

También existe la opción de añadir un identificador de placa.

Después, hacer *click* en *"start measurement".* Se realizará un ajuste automático de la ganancia en los modos de intensidad de fluorescencia y absorbancia.

Una vez iniciada la medición, puede abrir la pantalla "*current state*" para ver los valores de medición.

Nota: Para las mediciones de absorbancia se utilizará un tiempo de estabilización de 0,5 s, para los otros métodos 0,2 s. Las mediciones de fluorescencia se realizarán utilizando 10 destellos por pocillo, las mediciones de absorbancia 20 destellos por pocillo.

Medición utilizando protocolos pre-definidos:

Utilice el método de medición estándar basado en protocolos predefinidos, si desea medir sólo una parte de la microplaca, si desea realizar una medición cinética, utilizar emisión dual / multicromática, si necesita inyecciones o agitación.

Image: 1Image: Definición de protocolos:

Para crear un nuevo protocolo, o para editar uno ya existente:

- Hacer click en el icono "Manage protocols"
- Hacer doble click en el nombre del protocolo para editarlo, o en new para crear uno nuevo. Elegir el método de medición y el modo de lectura:
 - *End point* para medidas individuales.
 - *Plate mode* para cinéticas lentas.
 - Well mode para cinéticas rápidas.
 - Well scan para escanear (útil si se utilizan pocillos largos y si las muestras no están distribuidas igual)

Measurement	Method
Eluorescence	ce Intensity
Ime Resol	ved Fluorescence
Fluorescend	ce Pglarization
O Luninescen	ice
Absorbance	,
AlphaScree	6
Reading Mod	
Endpoint	
Elate mode	(slow kinetics)
🔿 Well mode	(flash kinetics)
Wel scanni	ng

- Dentro de la ventana de definición de protocolo:
 - Poner un nombre al protocolo.
 - Elegir la microplaca que va a ser utilizada.
 - Elegir entre medida precisa o rápida, dependiendo del ensayo.
 - Plate Mode kinetics: escribir el número de ciclos (cuántas veces pasará el lector por la placa)
 - Well mode kinetics: escribir el número de intervalos (cuántas veces el lector leerá el pocillo),
- Elegir los filtros de excitación y emisión que se desea utilizar.
- Seleccionar la hoja de distribución e introducir la posición de las muestras, blancos y estándares si los hubiese.

ontent.	0.00	1000	10000		1.50		T as 1						
Sample Blank Standard	96	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Empty	A	SA1	SAZ	SA3	SA4	BA	XA1	XA2	XA3	XA4	XA5	XAG	XA7
Groups I On H •	в	SB1	582	583	SB4	BB	X81	XB2	XB3	XB4	XB5	жве	XB7
Index	С	SC1	SC2	SC3	SC4	BC	XCI	XC2	XC3	XC4	XC5	XC6	XC7
Start value: 5 📑	D	SD1	SD2	SD3	SD4	BD	XD1	XD2	XD3	XD4	XD5	XD6	XD7
Replicates	Е	SE1	SE2	SE3	SE4	BE	XE1	XE2	XE3	XE4	XE5	XE6	XE7
e <u>H</u> orizontal ⊚ ⊻ertical	F	SF1	SF2	SF3	SF4	BF	XF1	XF2	XF3	XF4	XF5	XF6	XF7
eading grection:	G	S61	S62	SG 3	SG4	BG	X61	X62	X63	XG4	X65	XG6	XG7
	н	SH1	SH2	SH3	SH4	BH	XH1	XH2	хнз	XH4	XH5	ХН6	XH7

- Si se utilizan estándares y/o dispensadores de reactivo rellenar los valores en la ventana "concentrations/ volume/ shaking".
- Hacer *click* en *"check timing"*. Proporciona información sobre el menor tiempo de ciclo *("Plate mode")* o de intervalo *("Well mode")* posible. Estos valores pueden modificarse, introduciendo un valor más alto en la hoja *"Basic parameters"*

lasic Parameters Lapor	ut Concentrations / Volumes / Shaking	Timing Overview Outp	ut	
Protocol game: Gre	senlight	Liphe:		Linnmern
Microplate: DD	RNING 384 LOW FLANGE	Iop optic	Bottom aptic	
- Filter Settings		Speed and Precision		7
No. of multichromatics	(18): 1 😕	(1) Bapid	Precise	
		No. of intervals	(11000): 10	
485 • 520		Interval time	(0.02100 s); [[[[[[[
- Olbital Averaging -				
On				
Min. interval time 1:	120 s Total mass time/well 2 s			
	La			

Medición utilizando protocolos pre-definidos:

Click en el icono "start measurement".



 Es posible definir hasta 3 identificadores de placa en la hoja "gain adjustment /plate IDs"

ain Ad	ijustment	/ Plate II	De Sar	nple ID s	/ Dilution	Factors							
Chang	ge jayou												Gain Adjustment
96	1	z	3	4	5	6	1	8	а	10	п	12	Lorget m ^{P:} 35
A	S1	S1									S1	S1	Use advanced options >>
B	S1	S1				S1	S1				SI	S1	
C						S2	S2						G.win
D						S 3	S 3						Qhannel A: 392
E						S4	54						Channel <u>B</u> : 408 📮
F						S5	S5						Channel A Channel
6	S1	S1				S6	S6				S1	S1	Raw results: 25880 23643
н	S1	S1				в	в				S1	S1	Gain adjustment Stop
Nate	Ident	ificatio	n										A COLORADO
01: <	protocol				• 1	<u>D</u> 2: <me< td=""><td>thod></td><td></td><td></td><td></td><td>· ID3</td><td>t <ser_nu< td=""><td>mber> •</td></ser_nu<></td></me<>	thod>				· ID3	t <ser_nu< td=""><td>mber> •</td></ser_nu<>	mber> •
Aut	tomatical	ly enter ti	ne plate	Ds prev	iously us	ed with th	vis protoc	of					Get last IDs
o, of e	executed	l <u>r</u> uns sin	ce progra	am start.	0	T	otal no. o	l execut	ed runs:	1389			Ryn statistics:
								Ġ		000500.00	1 6		

- El valor requerido debería ser el 90% para las lecturas "endpoint". (dando los valores más altos alrededor de 260.000 - 10% = 234.000).
- Para mediciones de cinética, el valor requerido se encuentra entre 10-50% (esto es dependiente del aumento de señal esperado)

El objetivo de un ajuste de ganancia es optimizar la amplificación de la señal para que los resultados tengan la máxima sensibilidad y rango dinámico. La ganancia suele realizarse en el pocillo que contiene el estándar con la mayor concentración de fluoróforo (mayor intensidad). Esto ajusta la ganancia para que no haya desbordamiento en los pocillos de mayor intensidad (un desbordamiento significa que las unidades fluorescentes relativas de un pocillo superan el rango máximo, por ejemplo 260.000 unidades fluorescentes).

Nota: El ajuste de ganancia para los protocolos del método de absorbancia se realiza automáticamente como parte de la medición, por lo que la opción de ajuste de ganancia no existe cuando se utiliza el método de absorbancia.

• "Start measurement".

• Análisis de resultados

Para ver los resultados durante la lectura, hacer *click* en el icono "*Current State*" (tiene diferentes opciones de visualización de datos disponibles).

Para realizar cálculos utilizar el software MARS Data Analysis:

- Cerrar la ventana "Current State".
- Hacer *click* en el icono "MARS".



- En la ventana "Manage Test Runs":
 - Hacer doble *click* sobre el nombre del experimento que se desea analizar.
- Análisis de los datos:
 - Seleccionar los datos para que aparezcan en el área de trabajo con el árbol de navegación en el lado izquierdo de la ventana principal.

Navigation 무	-	ficroplate 1	Ver I	Table View	Spe	then It's	Standard Cu	ne 21	Protocol Info	evalue	21 21 OFR #	at 11		
Data Noder STARNA (4203) El 2 Test Settings	Test E01: Abie	Name: S Pale No 1 stance so	TARNA 12345. ID2 rectam	1 nen 18%/ 18	03 415 023	a .					Da	Ar: 2007-0	704 Time 1:	10.21
Laxout Standard	X	1000	tite legend	n friccola	94	Spectry	<i>n</i> ,							
Sample IDs.														
1 Temperature	A	1	2	2		5	1.	7	8	9	30	311	12	19
Spectrum blank.														L
Nave Date (452 red Blank covercted	9.					W	el 1975							1
Erea representit	C						-		h		34			
E O' Stafetice Standard deviation n	D			-	-				5.	-	20	-	math.	
	-			-	20-	-	m		m	17	-	-	- Man	
	1		-				n		m	-	M		-uli	18
	F.				-		m		h		h		al I	Zo
	6		-						5	1	20			
				-	2000	-	2		n	1	-		- Mar	1
					5000		m		n		M		mall	14
	Lege	nt .	and and											-

- Utilizar el asistente de cálculo estándar para realizar un cálculo rápido del ajuste de las curvas, o utilizar los menús de cálculo para definir lo que se desea calcular y visualizar.
- Para ver una curva estándar, abrir la ventana "Standard Curve". Los cálculos se muestran en las siguientes ventanas: "Microplate view" y "Table View".
- Para eliminar valores extremos, simplemente se ocultan en la ventana "Microplate view" utilizando la combinación "CONTROL+T".

• Para experimentos de cinética (más de un ciclo o intervalo medido), escoger los rangos de interés (Calc. Start y Stop), y los valores de los datos de esos rangos pueden analizarse utilizando cálculos cinéticos.

ANEXO I: Exportar Resultados

Los datos pueden exportarse a Excel desde las páginas de "*Microplate view*" y "*Table view*" haciendo clic en el botón Excel que aparece en la parte superior izquierda de la página.

Cada hoja de Excel creada, muestra en la parte superior de la página la información detallada del experimento.

Si se selecciona más de un experimento, cada uno de ellos aparecerá en una tabla separada dentro de la hoja Excel.

Si el experimento exportado tiene más de un ciclo/intervalo, se preguntará si desea exportar sólo el ciclo/intervalo actual o todos. Si decide exportar todos, los datos de cada ciclo/intervalo aparecerán en una nueva hoja.

Si los datos exportados contienen el resultado de un cálculo de ajuste estándar, se creará una segunda hoja en Excel con el parámetro de resultado del cálculo de ajuste estándar.

	A	B	C	D	E	F	6	H	1	J	К	L	M
1													
2													
3		User: USER			Path: C:\Pro	gram File:	BMG\Om	ega\User\	Data\			File Name:	4201_dbf
4		Test Name:	FI RHODA	MIN KINET	nc	0000000000				Date: 2007-	02-26	Time: 2:23:	49 PM
5		ID1: Fluores	cence inte	ensity									
6		ID2: Kinetic	with Bichr	omatic									
7		ID3: 413-044	15										
8		Fluorescend	e (FI), mu	tichroma	tic								
9													
10													
11		1. Layout											
12		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
13	A	X13 A	X14 A	X15 A	X16 A	X17 A	X18 A	X19 A	X20 A	X21 A	X22 A	X23 A	X24 A
14	В		51 A	51 A	\$1 A		NA	CI A		51 B	51 B	\$1 C	\$1 C
15	c		52 A	52 A	52 A		NA	C2 A		52 B	52 B	\$2 C	52 C
16	D		\$3 A	\$3 A	\$3 A		NA	GA		\$3 B	53 B	\$3 C	\$3 C
17	E		\$4 A	\$4 A	54 A		ΡA	CL A		54 B	54 B	54 C	54 C
18	F		8 A	ΒA	ΒA		ΡA	C2 A		B 8	BB	B.C	B C
19	G		ΒA	ΒA	ВΑ		ΡA	C3 A		BB	BB	BC	BC
20	н	X1 B	X2 B	X3 B	X4 B	X5 B	X6 B	X7 B	X8 B	X9 B	X10 B	X11 B	X12 B
21													
22													
23		2. Raw Data	(485-P, 52	0-P)									
24		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
25	A	77	76	78	79	79	77	71	75	75	79	78	73
26	B		79	74	76		74	75		78	78	79	74
27	C		82	72	77		71	71		69	77	77	75
28	D		77	75	75		78	73		73	75	78	79
29	E	-	75	75	69		77	75		72	68	74	81
30	F		80	74	77		75	79		78	80	77	83
31	G		77	82	76		77	77		74	80	77	81
32	H	75	77	83	77	78	75	79	78	76	71	83	80