

# hERG 钾离子通道高通量安全性筛选

——IonWorks Barracuda 高通量全自动膜片钳系统多次加样检测方法的优势



## 特点:

- 超高通量——可以满足大批量化合物筛选的需求
  - »每小时>6,000 数据点
  - »384 通道同时记录
- 超低的运行成本
  - »稳定、可靠的设备
  - »低廉、高效的耗材
- 每孔连续加样方法记录得到的浓度效应数据结果类似于传统手动膜片钳记录结果
- 高一致性、可重复的数据,
  - »专利的 Population Patch Clamp 技术保证了高度可重复性记录

由于 hERG (人 ether-à-go-go 基因)被抑制后潜在的致死风险, 愈发凸显了在药物研发早期阶段开展候选药物 hERG 安全性筛选的重要性。因其运行高成本、低通量及对操作人员的高要求, 作为研究离子通道活性的和药理学特性金标准的传统膜片钳技术对于大批量的筛选需求来说明显不切实际。即使经过过去十多年全自动膜片钳系统的快速发展, 高成本和通量相对较低的因素任然限制了 hERG 离子通道的安全性筛选。

IonWorks Barracuda® 全自动膜片钳系统为制药和生物技术企业提供了真正的解决方案, 低成本、快速、高效地对数以千计的化合物进行 hERG 离子通道安全性筛选。384 道平行记录的性能以及低廉的耗材使得 IonWorks Barracuda 成为中、高通量大批量化合物筛选的理想设备。

每孔多次加样的方法带来的特点之一是所记录的量效数据类似于传统手动膜片钳记录的数据, 这样所产生的数据质量更可靠。这种方法可广泛用于多种离子通道的研究中, 特别是观察电压门控离子通道的化合物阻断效应的研究。

## 研究目的

采用每孔多次加样的方法可以增加通量并节省化合物筛选成本。本研究旨在评估在 IonWorks Barracuda 系统中进行 hERG 化合物安全性筛选中使用加样方法的效果, 并与 Barracuda 中另一种整板每孔单点加样的方法进行比较。

IonWorks Barracuda 系统支持每个刺激方案下最多 8 次加样, 且一次实验中刺激方案的次数不限, 从而在实际上来说每次实验的加样次数是没有限制的。

检测化合物浓度效应的药理学特性时, 在整个 384 孔记录板的每一个记录孔中可以采用从低浓度至高浓度的多次累积加样方法。这种单孔重复多次加样的方法有以下几方面优势:

- 增加通量
- 降低成本
- 与传统检测化合物作用于离子通道效应的方法一致, 每个细胞或记录位点加入化合物的多个浓度并检测其连续的梯度浓度效应。

典型的单孔 8 次加样实验需要大约 30 分钟, 产生>3000 数据点, 从而每小时可以得到>6000 个数据点。

IonWorks Barracuda 系统筛选 hERG 安全性化合物时也可以采用另外一种整板加样且每孔只加样一次的方式。在此方法下, 大约每 20 分钟完成一次 384 个数据点的采集, 从而每小时可以得到>1100 个数据点。

为了有效的比较上述两种加样方法的药理学数据, 本次实验使用了完全一致的 hERG 阳性抑制剂, 并采用 6 个浓度梯度进行检测。

## 结果

比较化合物多浓度效应的药理学特性时，单孔多次加样方法比整板单次加样增加了超过 4 倍的通量。

7 个 hERG 通道的阳性抑制剂在每个记录孔中连续添加 6 个梯度浓度。两种加样方法结果（单次加样和多次加样）的比较见表 1。通量每次实验增加至 2300 个数据点，每小时为 4600 个数据点。

表 1: IC<sub>50</sub> 值 (nM)

阳性药物	单次加样	多次加样	相差倍数
Astemizole	62	220	0.28
Cisapride	37	108	0.34
Pimozide	147	168	0.88
Terfenadine	332	766	0.43
Flunarizine	1000	2815	0.36
Quinidine	934	572	1.6
Imipramine	5842	2432	2.4

两种方法下每个化合物的平均 IC<sub>50</sub> 值。根据相差的倍数来看，两种方法的数据一致性很好，两者的具体数值均在半个对数范围内。

## 材料和方法

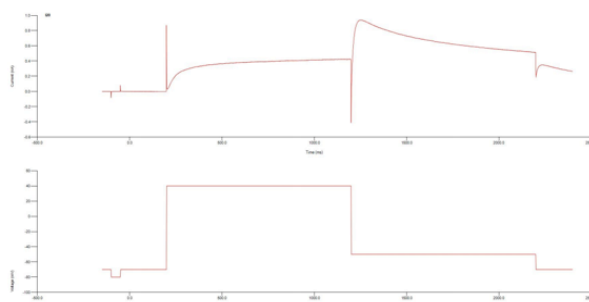
稳定转染人 K<sub>v</sub>11.1 通道的中国仓鼠卵巢细胞(CHO)来自 ChanTest 公司(Cleveland, OH)。本实验中所使用的所有试剂和药品均来自 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)。

### hERG 离子通道多次加样方法的开发

多次加样的方法中细胞需要进行多次的溶液交换并且电压刺激时间延长，从而增加了电流 run down 的可能性。为提高试验时间加长后细胞记录的稳定性，使用单次脉冲电压刺激方案代替原来单次加样方法中的 5 次脉冲电压刺激方案。

化合物溶于细胞外液中，浓度为 3 倍终浓度，含有 1% DMSO。实验时加入记录孔后被稀释至最终浓度，DMSO 的浓度为 0.33%。化合物加入记录孔后孵育一分钟后开始给予电压刺激，+40 mV 持续一秒，然后再施加 -50 mV 刺激一秒，用以检测尾电流峰值（图 1）。一次实验需要准备 6 个不同浓度梯度的化合物板，便于加样头完成 6 次加样。完整的实验方法确认后，依次检测选定的 7 个 hERG 阳性药物。

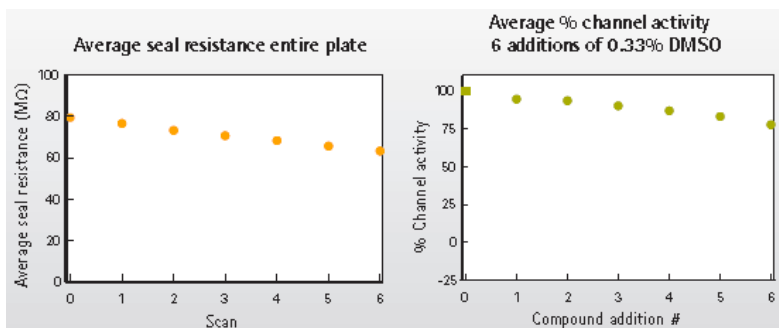
典型的 hERG 对照电流 (图 1)



细胞钳制在 -70 mV，持续 200 msec，然后在 +40 mV 下刺激 1000 msec，再回落至 -50 mV 持续 1000 msec，最后回到 -70 mV 持续 200 msec。

多次加样实验的记录稳定性结果见图 2。图中分别展示了其中一次实验所有 384 孔的平均封接电阻值，以及 24 个对照孔 0.33% DMSO 外液 6 次加样后得到的尾电流峰值为基准的平均通道激活程度。

平均封接电阻和尾电流峰值 (图 2)



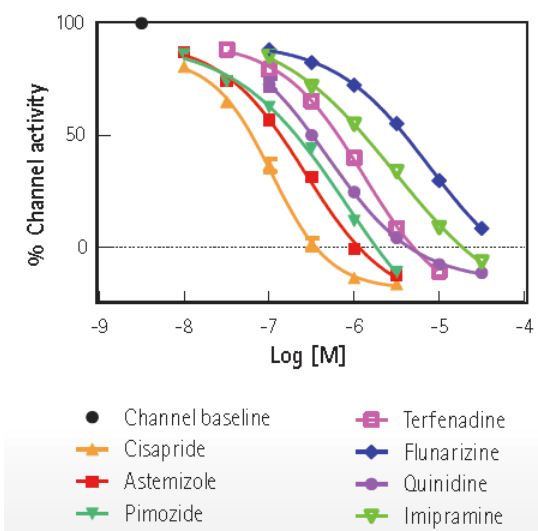
平均封接电阻来自每一个化合物添加前和添加后的电流记录。通道活性百分比的计算是以化合物添加后得到的峰值尾电流比上化合物添加之前的溶液对照条件下的峰值尾电流，再乘以 100%。

### 单孔多次加样方法的药理学特性：产生的累积浓度效应数据类似于传统膜片钳技术方法

在 7 个 hERG 阳性药物药理学验证实验中，每次实验需要连续监测 6 块化合物板。每个化合物板只有每个待检测化合物的一个浓度，每个化合物重复 24 个孔。第一块化合物板的浓度最低，第六块化合物板的浓度最高。

在 7 次独立的实验中各自得到一个量效曲线和相应的 IC<sub>50</sub> 值。图 3 展示了一个代表性实验中得到的药理学曲线。

多次加样实验中的 hERG 离子通道的浓度依赖性抑制 (图 3)



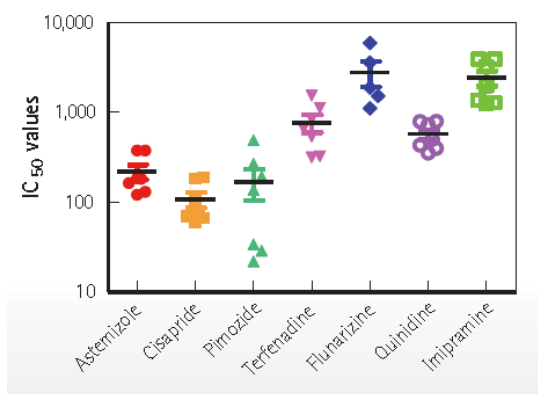
一个代表性实验中的量效曲线。通道活性百分比的计算是以化合物添加后得到的峰值尾电流比上化合物添加之前的溶液对照条件下的峰值尾电流，再乘以 100%。每个数据点代表了 24 个孔的平均值。

### 化合物多次添加方法的数据重复性检测

筛选实验中数据的稳定性是非常重要的。采用前述已优化好的实验条件，所有七次阳性 hERG 抑制剂的药理学数据均表现出良好的可重复性。六次化合物添加实验的稳定性展现在图 4 中。这种稳定性尤其重要，体现在加样后及施加电压刺激后的稳定电流记录的技术要求方面。

其中一个检测的阳性药物，哌咪清 (Pimozide)，观察到其重复性低于预期。这可能与化合物的高亲脂性相关，从而造成了化合物在筛选过程中多数的塑料材料环境下的不稳定性。

hERG 多次加样实验数据的可重复性 (图 4)



## 总结

本次实验验证了单孔多次加样方法在保证数据质量的前提下，可以显著增加通量且降低运行成本。

- 通量显著的从 1100 增加至 4600 个数据点每小时。
- 药理学结果方面，单次加样和多次加样的 IC<sub>50</sub> 值保持很好一致性。
- 整个实验结果保持稳定性和重现性
- 累积浓度效应数据类似于传统膜片钳技术方法

## 参考文献

Application protocol: "Validation of the IonWorks Barracuda System for hERG Ion Channel Assay", by Karen Cook, M.S., James L. Costantin, Ph.D., and Xin Jiang, Ph.D., Molecular Devices, LLC (2011)

### Contact Us

Phone: +1-800-635-5577  
Web: [www.moleculardevices.com](http://www.moleculardevices.com)  
Email: [info@moldev.com](mailto:info@moldev.com)

Check our website for a current listing of worldwide distributors.

### Regional Offices

USA and Canada +1-800-635-5577  
Brazil +55-11-3616-6607  
China (Beijing) +86-10-6410-8669  
China (Shanghai) +86-21-3372-1088  
Germany 00800-665-32860

Japan (Osaka) +81-6-7174-8831  
Japan (Tokyo) +81-3-6362-5260  
South Korea +82-2-3471-9531  
United Kingdom +44-118-944-8000



**Molecular  
Devices**