

# 使用SpectraMax多功能微孔板读板机进行 cAMP HiRange检测

## 简介

在这篇应用文献中，我们展示了如何用SpectraMax® i3、SpectraMax® Paradigm® 和SpectraMax® M5e多功能微孔板读板机进行可靠的、高通量的HTRF®检测，并具有完美的Z'因子和高重复性的EC<sub>50</sub>值。

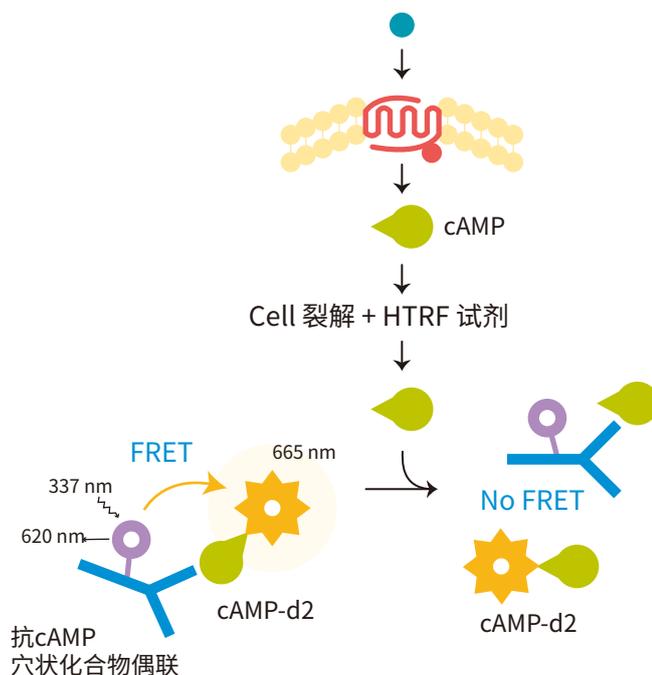
HTRF®是Cisbio Bioassays公司开发的一项检测生物分子相互作用的多用途技术1。这项技术结合了荧光共振能量转移(FRET)技术和时间分辨(TR)荧光测定，可消除短寿命的背景荧光。这一检测使用供体和受体荧光基团。当供体和受体彼此足够接近时，能量源(如氙闪光灯)激发供体使能量转移到受体上，受体发射出特定波长的荧光。

HTRF使用4种专门的荧光基团，能够组合成一对供体-受体TR-FRET基团。供体为铕(Eu3+)的穴状化合物和铽(Lumi4™-Tb)的穴状化合物，其长寿命荧光可以用于时间分辨荧光检测中1。两种受体分别为XL665和d2，用于HTRF检测中。这两种受体的激发光谱均与HTRF供体的发射光谱重叠。每个受体的发射峰都在665nm且供体在这一范围内没有发射光或发射光很弱。最初的HTRF受体XL665，是一种从红藻中纯化出的藻胆蛋白色素。第二代受体d2是一种经过修饰的别藻蓝蛋白，比XL665小100倍且可以减少可能在XL665检测中出现的空间位阻问题。

HTRF cAMP HiRange试剂盒能够在细胞样品中对环腺苷酸(cAMP，环腺苷3', 5' 一磷酸)进行定量。cAMP在G蛋白偶联受体(GPCR)信号转导中是一种关键的第二信使。当配体结合到GPCR，构象改变就会发生，激活受体接着激活G蛋白。进一步的信号转导取决于激活的G蛋白类型。Gs的激活导致腺苷酸环化酶调控cAMP的上调。细胞中产生的自由cAMP与d2-标记的cAMP竞争性结合抗cAMP穴状化合物抗体，因此，细胞内cAMP的增加会导致FRET降低，检测到的665nm荧光发射也会下降(图1)。

## 优势

- 高度可靠的均相实验
- Z' 因子 ≥ 0.9
- 流程式且稳定的高通量(HTS)检测
- SoftMax Pro软件预设实验模板快速获得结果



**图 1 cAMP 检测原理。**细胞中产生的非标记cAMP与d2标记的cAMP竞争结合抗cAMP穴状化合物偶联。因此，细胞中cAMP的增加导致了FRET的降低。

## 材料

- cAMP HiRange 1000 测试 (Cisbio P/N 62AM6PEB)
- 黑色和白色低体积384-孔微孔板 (Greiner P/N 784076 和 784075)
- SpectraMax i3 多功能微孔板读板机 (Molecular Devices)
- SpectraMax Paradigm 多功能微孔板读板机 (Molecular Devices)
- SpectraMax M5e 多功能微孔板读板机 (Molecular Devices)
- HTRF 检测卡盒 (Molecular Devices P/N 0200-7011)

## 方法

HTRF cAMP HiRange试剂盒由Cisbio Bioassays公司提供。按照cAMP HiRange HTRF药品说明书准备终浓度范围从0.17 nM到2800 nM的cAMP标准品。不含cAMP的阳性质控(最大FRET)和不含cAMP或cAMP-d2的阴性质控包含在内。按照表1中所述, 每孔添加20  $\mu$ L试剂。

## 数据分析

使用Cisbio专利的基于双发射波长检测的比值算法分析HTRF检测。616nm发射波长的供体作为内参, 同时665nm发射波长的受体作为测定生物学反应的指示。这种比例测定减少了孔与孔之间的差异并降低了化合物干扰。在第4步计算的Delta F反映了测定时的信号相对于背景大小, 用于内部测定的比较。

结果通过665 nm/616 nm比值计算, 以如下Delta F表示:

$$1. \text{ 比值} = \frac{\text{发射}_{665\text{nm}}}{\text{发射}_{616\text{nm}}} \times 10^4$$

$$2. \text{ 平均比值} = \frac{\sum \text{比值}}{2}$$

$$3. \text{ CV} = \frac{\text{标准差}}{\text{平均比值}} \times 100$$

$$4. \text{ Delta F} = \frac{\text{标准品或样品比值} - \text{比值}_{\text{neg}}}{\text{Ratio}_{\text{neg}}} \times 100$$

(比值<sub>neg</sub> = 阴性质控比值)

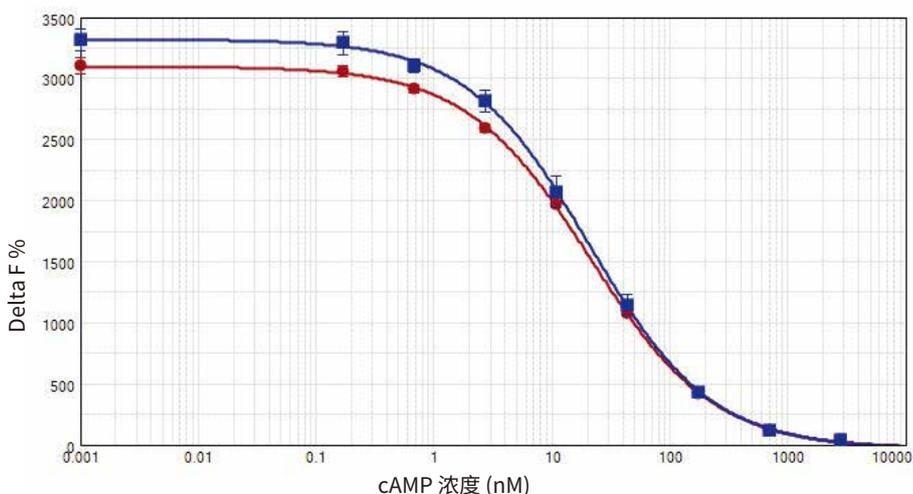
阴性质控	阳性质控	标准曲线	测定质控
5 $\mu$ L 稀释	5 $\mu$ L 稀释	5 $\mu$ L cAMP 标准品	5 $\mu$ L cAMP 质控
5 $\mu$ L 稀释			
5 $\mu$ L 偶联物 & 裂解缓冲液	5 $\mu$ L cAMP-d2		
5 $\mu$ L 抗-cAMP-穴状化合物			

**表 1. 384-孔低体积孔板测定的建立。**孔板在室温下孵育一小时。时间分辨荧光在SpectraMax多功能微孔板读板机上检测(请见表2仪器设置)。微孔板优化和读数高度校准均在SpectraMax i3和SpectraMax Paradigm读板机上进行以确保最优的测定灵敏度和动态范围。

SpectraMax i3 和 SpectraMax Paradigm		SpectraMax M5e	
光学设置	HTRF 检测卡盒	读数模式	TRF
读数模式	TR-FRET	读书类型	Endpoint
读数类型	Endpoint	波长	Ex 314 nm Em 620 nm Em cutoff 570 nm Em 665 nm Em cutoff 630 nm
波长	Ex 340 nm Em 616 nm Em 665 nm	TRF 设置	Integration Delay: 50 $\mu$ s Integration Time: 400 $\mu$ s
PMT和光学设置	Number of Pulses: 30 Excitation Time: 0.05 ms Measurement Delay: 0.02 ms Integration Time: 0.2 ms Read Height: 7.5-7.7 mm*	PMT和光学设置	Flashes per read: 100

\* 最优读数高度取决于微孔板、测定体积和读板机光学参数。

**表 2. SpectraMax i3、SpectraMax Paradigm和SpectraMax M5e读板机的优化仪器设置。**



**图 2. 白色和黑色微孔板比较。**在SpectraMax Paradigm读板机上测定的HTRF cAMP标准曲线。红色圆形: Greiner白色孔板; 蓝色方形: Greiner黑色孔板。在这一实例中, 使用黑色孔板可以增加检测窗从3020 到 3253(单位Delta F%)。

Z' 因子由阴性(无cAMP, 无cAMP-d2)和阳性质控(无cAMP)计算得到2。

利用SoftMax® Pro软件生成和分析数据, 包含一些预设的HTRF实验模板以简化检测和分析。

## 结果

使用SoftMax Pro软件的4-参数曲线拟合如上所述进行数据分析和做图。依据表2的读板机参数设置获得最佳结果。当延迟时间、整合时间和脉冲数增加, 会观察到DF%的下降。与白色微孔板(图2)相比, 使用黑色低体积384-孔微孔板可使检测窗从3020增加到3253。然而, Z' 因子, 考虑到阳性和阴性质控的检测窗和标准差以及EC<sub>50</sub>值在两个孔板类型中非常相似(表3)。(注意: 当使用SpectraMax M5e多功能微孔板读板机, 需要白色孔板。)

SpectraMax i3和SpectraMax Paradigm读板机在逐一比较相同测试孔板时得到的结果基本一致(图3)。针对这一测试, 利用了白色微孔板。检测窗为3004和3051, 且Z' 因子分别是0.92和0.90。EC<sub>50</sub>值是19.1 nM, 相比于发布值(表3)。SpectraMax M5e多功能微孔板读板机得到相似的Z' 因子和EC<sub>50</sub>值。

SpectraMax Paradigm读板机得益于双PMT配置而比其他读板机更快, 使之可以同时读取两个HTRF发射波长(表3)。

检测	SpectraMax i3 读板机	SpectraMax Paradigm 读板机	SpectraMax M5e 读板机
cAMP EC <sub>50</sub> (nM)	19.1	19.0	17.5
Z' 因子	0.92	0.90	0.90
读数时间 (384 wells)	5:03	2:17	14:00

表3 cAMP HiRange标准曲线结果总结。

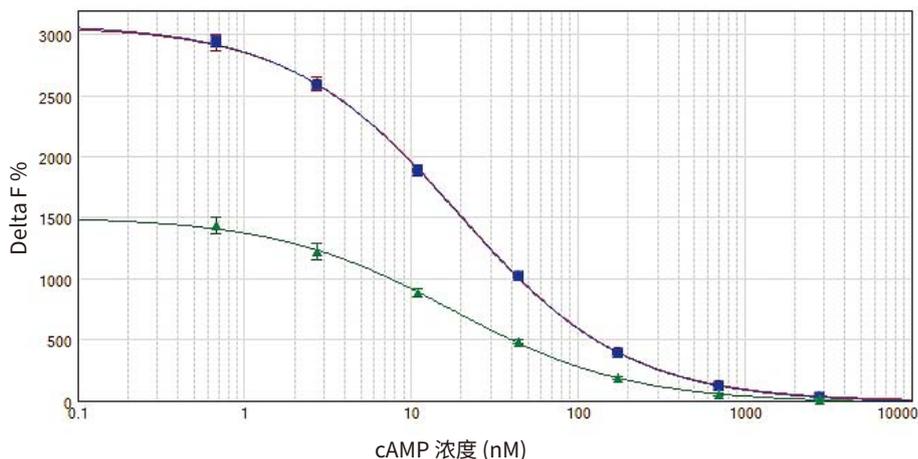


图3 HTRF cAMP 标准曲线。SpectraMax i3(红色圆形)、SpectraMax Paradigm(蓝色方形)和SpectraMax M5e(绿色三角)读板机上HTRF cAMP校准曲线测定。SpectraMax i3和SpectraMax Paradigm读板机结果完全一致。SpectraMax M5e读板机的检测窗稍小但检测质量很高。

## 总结

SpectraMax i3和SpectraMax Paradigm读板机可配置具有高通量筛选能力且HTRF认证的检测卡盒。当在SpectraMax Paradigm读板机上使用时, 此卡盒能进行双发射同时检测从而加快读数速度。在三个读板机中, cAMP

HiRange测定得到的完美Z' 因子表明了多功能检测系统的可靠性能。采用SoftMax Pro软件自带的HTRF预设实验模板大大简化了数据采集和分析。

## 参考

1. <http://www.htrf.com/htrf-technology>
2. Zhang, J. H., Chung, T. D. Y., and Oldenburg, K. R. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *Biomolecular Screening*4(2): 67-73.

与以下Molecular Devices 系统兼容



SpectraMax i3x 多功能微孔板读板机



SpectraMax Paradigm 多功能微孔板读板机



SpectraMax M5e 多功能微孔板读板机



扫一扫关注我们  
的官方微信