

使用 SpectraMax 微孔板读板机进行 HTRF IP-One Gq 检测

Caroline Cardonnel | Sr. Applications Scientist | Molecular Devices

简介

HTRF[®] 是 Cisbio 公司开发的用于检测生物分子相互作用的实验技术¹。它将荧光共振能量转移 (FRET) 技术与时间分辨 (TR) 荧光技术相结合, 可以消除荧光寿命较短的背景荧光。该检测方法使用铕 (Eu³⁺) 或铽 (Lumi4™ -Tb) 的穴状化合物作为供体, 荧光团 (XL665 或小分子 d2) 作为受体。当供体和受体距离足够近时, 供体被一个能量源激发, 可以引发能量转移到受体, 使其在特定波长发出荧光。

在这里, 我们展示了如何使用 SpectraMax[®]i3x 和 SpectraMax[®]iD5 多功能微孔板读板机应用 HTRF 技术进行 Gq- 偶联受体的分析。G 蛋白偶联受体的分析主要通过检测 cAMP 和 IP3 这两条信号转导通路调控介导的细胞内钙离子水平的升高。Cisbio 公司的 IP-One Gq 试剂盒通过检测 IP3 的稳定下游代谢产物——磷酸肌醇 (IP1) 的积累, 为钙离子检测提供了一种替代方法 (图 1)。

优势

- 经 HTRF 认证确保仪器性能
- 高灵敏度和宽动态范围
- 分析功能强大, 适用于高通量分析 (HTS) 平台

在氯化锂 (LiCl) 存在的条件下, IP1 的降解被抑制并在信号细胞中积累 (图 1)。在 IP-One HTRF 实验中, 带有 d2 受体的 IP1 可以与细胞产生的天然 IP1 竞争, 结合带有穴状化合物供体的 IP1 特异性单克隆抗体。细胞产生的未标记 IP1 (天然 IP1) 的增加会导致 TR-FRET 的中断和 HTRF 信号强度的减弱 (图 2)²。IP-One 检测可用于表征贴壁细胞或悬浮细胞中作用于 Gq- 偶联受体的化合物。

实验材料

- IP-One Gq 试剂盒, 1000 次 (Cisbio cat. #62IPAPEB)
- 白色 384 孔微孔板 (Greiner cat. #784075)
- SpectraMax i3x 多功能微孔板读板机 (Molecular Devices cat. #I3X)
- HTRF 检测卡盒 (Molecular Devices cat. #0200-7011)
- SpectraMax iD5 多功能微孔板读板机 (Molecular Devices cat. #ID5)
- HTRF 检测系统 (Molecular Devices cat. #6590-0144; 包含增强型 TRF 模块, 激发和发射滤片)

方法

如产品使用说明书所示³, IP1 标准品制备的最终浓度范围为 1.9 nM 至 7700 nM。包括一个没有任何未标记 IP1(最大 FRET) 的阳性对照和一个没有 IP1 或抗 IP1-d2 抗体的阴性对照。如图 3 所示, 试剂的最终用量为每孔 20 μ L。将微孔板在室温下孵育 1 小时, 使用 SpectraMax i3x 和 iD5 读板机读取数据, 优化设置如表 1 所示。

调整延迟时间, 间隔时间和脉冲次数以优化设置, 直到 $\Delta F\%$ (请参见下面的数据分析) 显著增加。并且可以将表 1 中列出的优化设置应用到同一型号的任何酶标仪上, 即下面列出的 SpectraMax iD5 微孔板读板机的设置可以用于任何一台 SpectraMax iD5 读板机。但是, 当使用新类型的微孔板 (或大量微孔板) 或试剂体积发生改变时, 都应执行微孔板优化和读数高度调整, 以使读板机的光学系统对准化验板。这样可以确保最小的误差, 以及最佳的检测灵敏度和动态范围。

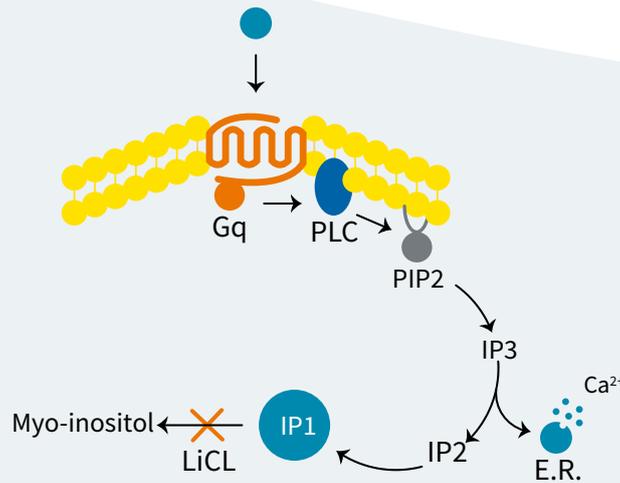


图 1 Gq 通路的激活。IP1 是第二信使 IP3 的下游代谢产物, 在 LiCl 存在时积累。

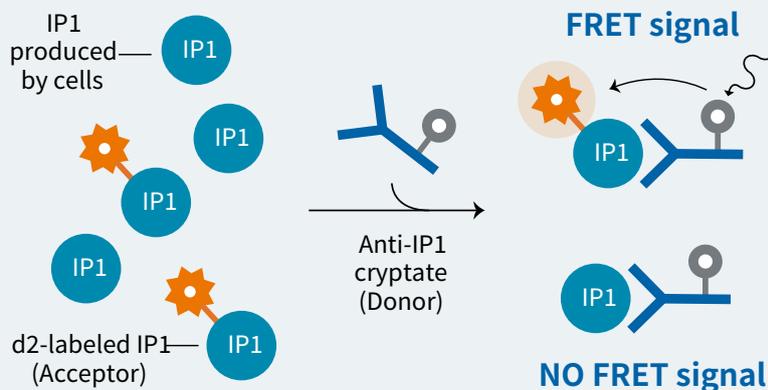


图 2 HTRF IP-One 竞争性结合实验的原理。d2 受体标记的 IP1 与天然 (未标记) IP1 竞争, 以结合供体标记的 IP1 特异性单克隆抗体。未标记 IP1 的增加会导致 TR-FRET 的中和和 HTRF 信号的减少。

数据分析

HTRF 分析使用 Cisbio 公司的专利比值测定法，该方法基于检测到的两个发射波长。将供体在 616 nm 处的发射作为内参，受体在 665 nm 处的发射作为被测生物反应的指示。这种比值测定方法可以减少孔间误差并消除复合干扰。在下面第 4 步中计算的 ΔF 反映了分析背景的信号，适用于批间分析的比较。根据 665 nm/616 nm 比值计算得到的结果用 ΔF 表示如下：

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

$$2. \text{Mean Ratio} = \frac{\sum \text{ratios}}{2}$$

$$3. \text{CV} = \frac{\text{Std deviation}}{\text{Mean ratio}} \times 100$$

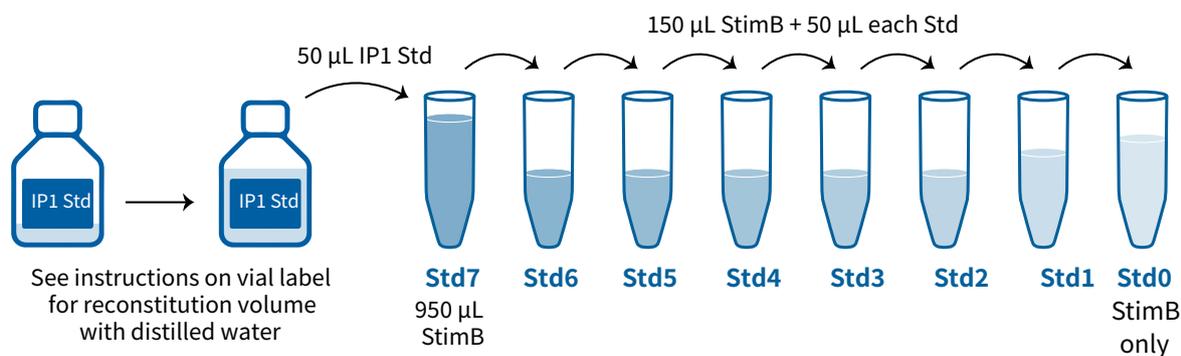
$$4. \text{Delta F} = \frac{\text{Standard or sample Ratio} - \text{Ratio}_{\text{neg}}}{\text{Ratio}_{\text{neg}}} \times 100$$

(Ratio_{neg} = Ratio of negative control)

使用 SoftMax®Pro 软件生成和分析数据，该软件包含预先配置的 HTRF 协议，可以简化使用上述方法进行检测和分析的流程。

结果

在 SpectraMax i3x 和 SpectraMax iD5 微孔板读板机上使用 SoftMax Pro 软件绘制标准曲线，并进行 4 参数曲线拟合 (图 4)，结果见表 2。使用 EC₅₀ 评估该测定方法的适用性，EC₅₀ 值应低于 150 nM。对于两个读板机，EC₅₀ 值均低于 85 nM，处于可接受范围内。Cisbio 将可接受的信噪比定义为 ≥ 20 ，两个读板机都满足这个标准。凭借这些结果以及所有标准的 CV 值均低于 6%，这些实验结果表明利用 SpectraMax i3x 和 SpectraMax iD5 读板机进行 IP-One 检测具有高灵敏度和宽动态范围。



Standard	Serial dilutions	IP1 working solution nM	IP1 final concentration nM
Std7	50 µL IP1 Std reconstituted + 950 µL StimB*	11000	7700
Std6	50 µL Std7 + 150 µL StimB	2750	1925
Std5	50 µL Std6 + 150 µL StimB	688	481.6
Std4	50 µL Std5 + 150 µL StimB	172	120.4
Std3	50 µL Std4 + 150 µL StimB	43	30.1
Std2	50 µL Std3 + 150 µL StimB	11	7.7
Std1	50 µL Std2 + 150 µL StimB	2.7	1.9
Std0 (positive control)	150 µL StimB	0	0

*StimB has to be first diluted with distilled water from 5X to a 1X solution (e.g. 1 volume of StimB 5X + 4 volumes of distilled water).

图 3 384 孔微孔板的测定设置。IP-One Gq 试剂盒中包含“StimB”（刺激缓冲液）。

	SpectraMax i3x	SpectraMax iD5
	Tb donor/red acceptor	Tb donor/red acceptor
Required components	HTRF Detection Cartridge	HTRF Detection System
Excitation	340 nm	340/70 nm
Emission	Donor: 620 nm Acceptor: 665nm	Donor: 616/10 nm Acceptor: 665/10 nm
Number of flashes	30	30
Integration delay	30 μ s	20 μ s
Integration time	400 μ s	200 μ s
Other	Run Microplate Optimization and Read Height Adjustment when running the assay for the first time, as well as when using a new lot of plates or a different assay volume (Settings > More Settings > Show Pre-Read Optimization Options in SoftMax Pro Software).	

表 1 SpectraMax i3x 和 iD5 微孔板读板机的仪器设置。这些设置针对 IP-One Gq 的检测进行了优化, 可能与其他 HTRF 检测使用的设置略有不同。

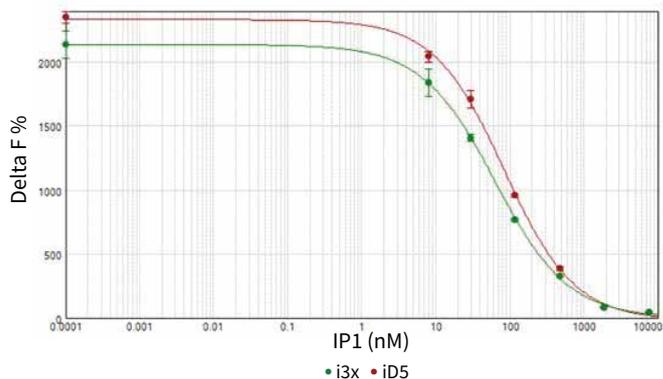


图 4 HTRF IP1 标准曲线。在 SpectraMax i3x (绿色) 和 SpectraMax iD5 (红色) 读板机上测定的 HTRF IP1 标准曲线。SpectraMax iD5 的分析窗口稍大, 但两种读板机的分析质量都非常好 (CV < 6%)。

Parameter	Passing	SpectraMax i3x	SpectraMax iD5
EC ₅₀	≤ 150nM	63.1 nM	84.1 nM
Signal/noise	≥ 20	22.4	24.5

表 2 HTRF IP1 标准曲线结果汇总。

结论

SpectraMax i3x 和 iD5 微孔板读板机分别配备 HTRF 认证的检测卡盒或 HTRF 认证的检测系统。根据 Cisbio 的认证标准, 两个读板机都具备检测 IP1 浓度的能力。使用预置 HTRF 协议的 SoftMax Pro 软件可以简化数据采集和分析流程。

参考文献

1. <http://www.htrf.com/htrf-technology>
2. Garbison KE, Heinz BA, Lajiness ME. IP-3/IP-1 Assays. 2012 May 1. In: Sittampalam GS, Grossman A, Brimacombe K, et al., editors. Assay Guidance Manual.
3. https://www.cisbio.eu/media/asset/c/i/cisbio_dd_pi_62ipapeb-62ipapec-62ipapej.pdf



更多精彩内容
尽在官方微信

美谷分子仪器 (上海) 有限公司

全国咨询热线: 400-820-3586

上海 电话: 86-21-3372 1088

北京 电话: 86-10-6410 8669

成都 电话: 86-28-6558 8820

台北 电话: 886-2-2656 7585

香港

www.MolecularDevices.com.cn Email: info.china@moldev.com

传真: 86-21-3372 1066

传真: 86-10-6410 8601

传真: 86-28-6558 8831

传真: 886-2-2894 8267

传真: 852-2289 5385

地址: 上海市长宁区福泉北路 518 号 1 座 501 室 200335

地址: 北京市朝阳区广渠东路 3 号中水电国际大厦 612 & 613 室 100124

地址: 成都市锦江区东御街 18 号百扬大厦 2208 室 610016

地址: 台北市内湖区堤顶大道二段 89 号 3 楼

地址: 香港中环皇后大道中 15 号置地广场 公署大厦 21 楼

