

使用SpectraMax M5e读板机进行 HTRF cAMP dynamic 2和IP-One检测

简介

SpectraMax® M5e多功能微孔板读板机具有双单色器，能够进行荧光、时间分辨荧光(TRF)、荧光偏振、光吸收和化学发光检测。它具有HTRF®(均相时间分辨荧光)认证的优势，使得生命科学和药物发现研究者们通过TRF检测的高度灵活性提高产出。

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。此技术结合了荧光共振能量转移(FRET)和TRF的特点，采用铕(Eu)的穴状化合物作为供体荧光基团和一种经过修饰的别藻蓝蛋白(XL665)或小分子d2作为受体荧光基团。当标记了铕穴状化合物和d2的生物分子相互作用时，FRET就会在供体和受体荧光基团间发生，可在665nm处检测到荧光发射，此时大部分穴状化合物的激发能量都以620nm荧光发射释放出来。孔与孔之间的差异通过利用Cisbio专利的HTRF比值算法校正，此算法使用的是665nm和620nm的荧光信号比值。

HTRF测定在SpectraMax M5e读板机上的表现通过使用两种不同的HTRF检测试剂展示。G-蛋白偶联受体信号转导通过检测两种主要通路，cAMP的调控和IP3介导的胞内钙离子水平增加。利用cAMP dynamic 2试剂中Eu的穴状化合物标记的单克隆抗-cAMP抗体和d2-标记的cAMP进行检测。

由细胞本身产生的cAMP与cAMP-d2竞争结合抗-cAMP抗体穴状化合物。细胞内cAMP的增加导致FRET降低，检测到的665nm荧光下降了。IP-One测定采用相似的方式并使用IP1特异的单克隆抗体，一种稳定的在氯化锂存在下富集于信号转导

细胞中的IP3下游代谢产物。665nm荧光与IP1浓度在校准品或细胞裂解物中成反比。这篇应用文献展示了两种基于细胞的检测数据和由cAMP dynamic 2和IP-One试剂盒得到的标准曲线。这些HTRF数据揭示了在SpectraMax M5e读板机上得到的完美动态范围和Z' 因子。

材料

- cAMP dynamic 2 试剂盒, 1000个测试 (Cisbio cat. #62AM4PEB)
- IP-One 试剂盒, 1000个测试 (Cisbio cat. #62IP1PEB)
- 细胞系: CHO-M1 (M1WT3; ATCC cat. #CRL-1985)
- 福斯高林(Sigma cat. #F3917)
- 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx; Sigma cat. #I7018)
- 氯化氨甲酰胆碱(碳酰胆碱; Sigma cat. #C4382)
- 白色384-孔微孔板 (Corning cat. #3705)
- SpectraMax M5e多功能微孔板读板机 (Molecular Devices)

注意: 通常在SpectraMax M5e上检测HTRF使用的是白色微孔板。为优化信号检测, 使用不透明白色微孔板而非底透板。

优势

- 于双单色器系统的灵活性
- 极宽的动态范围和完美的Z' 因子
- SoftMax Pro自带预设HTRF实验模板

方法

cAMP dynamic 2测定

CHO-M1细胞生长于添加了10% FBS、1% 青霉素/链霉素/谷氨酰胺和200 µg/mL G418的Ham F12培养基中。使用悬浮细胞进行cAMP dynamic 2测定。细胞于测定当天进行胰酶消化，重悬于无添加的Ham F12培养基中，并以每孔4,000细胞、10 µL体积接种于白色384-孔微孔板中。为了刺激cAMP产生，添加检测试剂前用10 µL终浓度为3 nM到1 mM福斯高林处理细胞一小时。测试孔中加入0.5 mM IBMX以抑制磷酸二酯酶介导的cAMP降解。

福斯高林处理一小时后，按照产品说明书中所述加入cAMP-d2、裂解缓冲液和抗-cAMP抗体-穴状化合物。细胞阴性质控包含接受了抗-cAMP抗体-穴状化合物、偶联物及不含cAMP-d2的裂解缓冲液的未处理细胞。FRET阴性质控对Delta F值的计算是必要的，其在HTRF产品说明书中有所强调³。所有样品和标准品的最终测定体积为40 µL，但是测定体积可以针对不同微孔板类型调整。

标准品按照cAMP dynamic 2 HTRF产品说明书所述准备。cAMP终浓度从0.17到712 nM，并且包括不含cAMP(最大FRET)的阳性质控。包含自由cAMP的质控用于检测测定的活性，不含cAMP或cAMP-d2的阴性质控(无FRET)用于计算Delta F。cAMP-d2添加于所有标准品和阳性质控中，而接受有偶联物的阴性质控和裂解缓冲液没有cAMP-d2。抗-cAMP抗体-穴状化合物添加于所有标准品和质控中。室温下孵育一小时后，在SpectraMax M5e读板机上进行微孔板读数。(请见表1 仪器设置)。

IP-One测定

CHO-M1细胞按上述方法培养。在测定前一天，细胞以每孔10,000-40,000接种于含有完全生长培养基的384-孔微孔板中。第二天，使用浓度范围从15 nM到33 µM的碳酰胆碱刺激细胞(刺激缓冲液包含用于准备碳酰胆碱浓度的氯化锂溶液)。刺激一小时后，IP1-d2偶联物、裂解缓冲液和抗-IP1抗体-穴状化合物添加于孔中。细胞阴性质控包含接受了抗-IP1抗体-穴状化合物、偶联物和不含IP1-d2的裂解缓冲液的未处理细胞。最终测定体积为40 µL，但是此cAMP测定可针对不同的微孔板类型调整体积。

读数类型	Endpoint		
读数模式	Time Resolved Delay: 50 Integration: 400 Top Read		
波长	Ex	Em	Cutoff
	314	620	570
	314	668	630
灵敏度	Readings: 100 PMT: Auto		
自动校正	On		
停留时间	Off		
进板速度	Normal		

表 1 SpectraMax M5e读板机仪器设置。

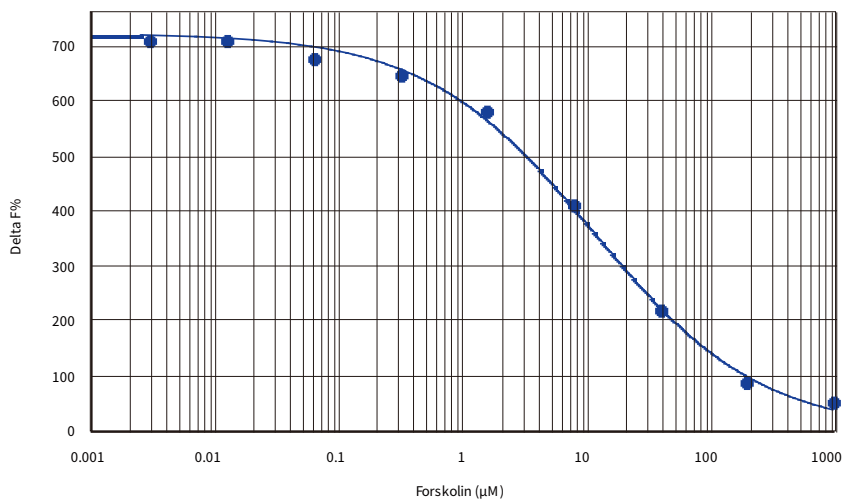


图 1 基于细胞的cAMP测定。CHO-M1中福斯高林剂量应答曲线 ($Z' = 0.86$, $EC_{50} = 11.4 \mu\text{M}$)。

福斯高林 (µM)	平均值	SD 比值	CV % 比值	平均Delta F%
1000.000	762	30.7	4.0	47
200.000	951	29.2	3.1	83
40.000	1633	84.3	5.2	215
8.000	2623	137.7	5.3	406
1.600	3508	134.5	3.8	576
0.320	3854	303.3	7.9	643
0.064	4008	106.7	2.7	673
0.013	4186	154.0	3.7	707
0.003	4185	133.6	3.2	707
0	4459	204.3	4.6	760

表 2 基于细胞测定的数据总结。

根据IP-One HTRF产品说明书所述在刺激缓冲液中溶解IP1标准品，使IP1标准品终浓度范围从21.5到22,000 nM⁴。孵育阳性IP1和不含IP1的阴性质控。IP1-d2添加于所有标准品和阳性IP1质控中，而接受了偶联物的阴性质控和裂解缓冲液不含IP1-d2。抗-IP1抗体抗体-穴状化合物添加于所有样品中。室温孵育一小时后，根据表1中的设置在SpectraMax M5e读板机上进行微孔板读数。

数据分析

根据Cisbio的指南使用SoftMax[®] Pro软件对cAMP和IP-One进行数据分析。SoftMax Pro软件中的4个不同的HTRF预设实验模板专为各种现阶段可用类型的HTRF测定设计以简化数据采集和分析。

FRET 计算如下：

$$\text{比值} = (\text{信号}_{665 \text{ nm}} / \text{信号}_{620 \text{ nm}}) \times 10000$$

$$\text{Delta 比值} = \text{标准品或样品比值} - \text{比值}_{\text{neg}}$$

(比值_{neg} 为阴性质控的比值)

$$\text{Delta F\%} = (\text{Delta 比值} / \text{比值}_{\text{neg}}) \times 100$$

仪器设置

波长、延迟和整合设置都已针对基于双单色器的SpectraMax M5e读板机进行了优化。尤其注意，XL665/d2的最佳发射波长为668nm而非HTRF产品信息中所说的665nm。

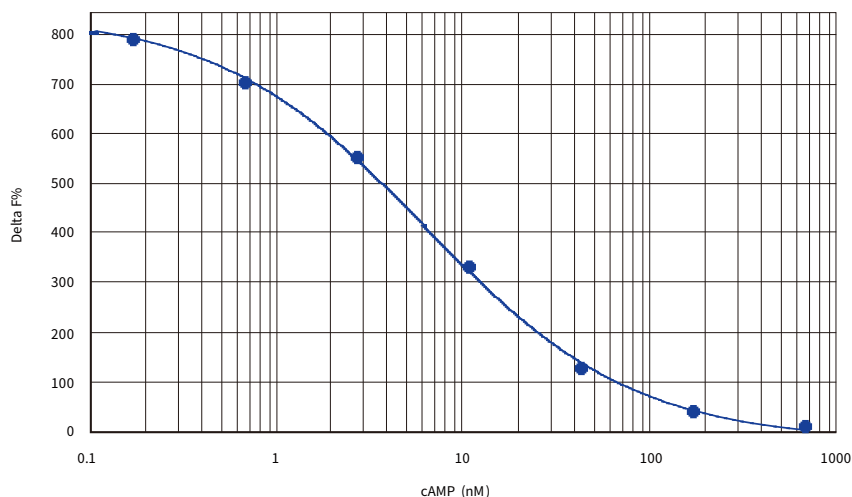


图2 cAMP标准曲线。cAMP标准曲线 ($Z' = 0.84$, $EC_{50} = 6.3 \text{ nM}$, 与产品说明书中给的值比较)。

cAMP (nM)	平均比值	SD 比值	CV % 比值	平均 Delta F%
712.0	515.2	22.8	4.4	5.4
178.0	674.9	12.6	1.9	38
44.5	1089.9	59.8	5.5	122.9
11.1	2088.7	149.5	7.2	327.2
2.8	3166.8	83.6	2.6	547.7
0.7	3910.1	190.9	4.9	699.7
0.2	4341	98.6	2.3	787.8
0	4610.1	227.9	4.9	842.9

表3 cAMP dynamic 2测定标准曲线数据总结。

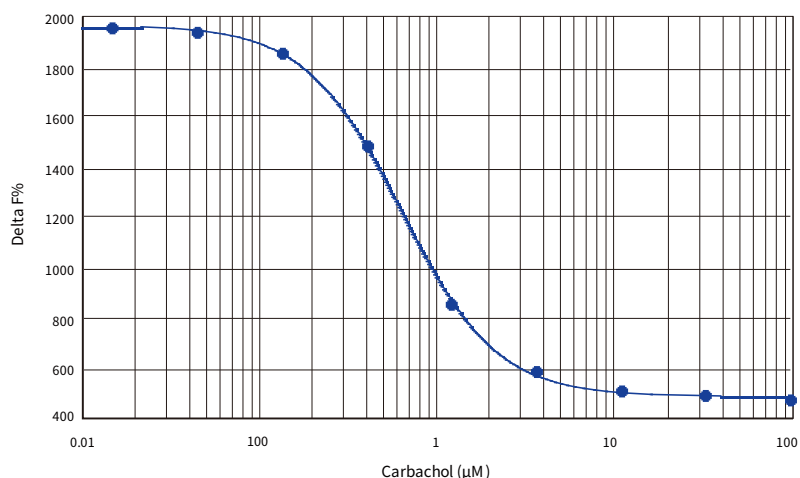


图3 基于细胞的IP1测定。CHO-M1细胞中碳酰胆碱剂量应答曲线 ($Z' = 0.91$, $EC_{50} = 0.64 \mu\text{M}$ 碳酰胆碱)。

结果

最佳结果来自基于细胞的cAMP测定，其使用384-孔微孔板并以每孔大约4,000 CHO-M1细胞接种(40 μ L检测终体积)。最优细胞密度根据细胞类型和特定测定条件可能改变。用福斯高林处理细胞一小时后，获得关于EC₅₀为11.4 μ M和Z' 因子为0.86的剂量应答曲线(图1)。使用Cisbio比值方程计算的Delta F%值范围从47到707(表2)，与观察到的cAMP标准曲线(图2，表3)相似。

在基于细胞的IP-One测定中，优化的细胞密度为384-孔微孔板每孔10,000个CHO-M1细胞(40 μ L最终测定体积)。碳酰胆碱刺激一小时得到的EC₅₀为0.64 μ M和Z' 因子为0.91的剂量应答曲线(图3)。使用Cisbio比值方程计算的Delta F%值范围从3402到12539(表4)。

根据IP-One HTRF产品说明书直接准备的IP1标准品生成的校准曲线其Z' 因子为0.84(图4)且Delta F%值范围从820到11883(表5)。

总结

具有HTRF认证的SpectraMax M5e多功能微孔板读板机多功能微孔板读板机提升了双单色器系统和多模式检测功能灵活性，扩展了研究者的检测方法范围。当在SpectraMax M5e读板机上运行IP-One和cAMP HTRF测定时，展示了非常宽的动态范围和范围从0.78到0.91的完美Z' 因子。使用SoftMax Pro软件的预设HTRF实验模板大大简化了数据分析。



扫一扫关注我们
的官方微信

碳酰胆碱 (μ M)	平均值	SD 比值	CV % 比值	平均 Delta F%
100.00	3402	141.5	4.2	463
33.33	3538	68.8	1.9	486
11.11	3646	42.7	1.2	503
3.7	4105	25.5	0.6	579
1.23	5720	120.3	2.1	847
0.41	9517	143.6	1.5	1476
0.14	11733	397.9	3.4	1843
0.05	12234	424.1	3.5	1926
0.02	12357	139.2	1.1	1946
0	12539	102.1	0.8	1976

表 4 基于细胞测定的IP-One数据总结。

IP1 (nM)	平均值	SD 比值	CV % 比值	平均 Delta F%
30800	820	28.6	3.5	44
7700	1389	71.0	5.1	144
1925	3011	127.7	4.2	429
481	6348	238.7	3.8	1015
120	9668	334.6	3.5	1598
30	11157	551.1	4.9	1860
0	11883	566.3	4.8	1987

表 5 IP-one标准曲线数据总结。

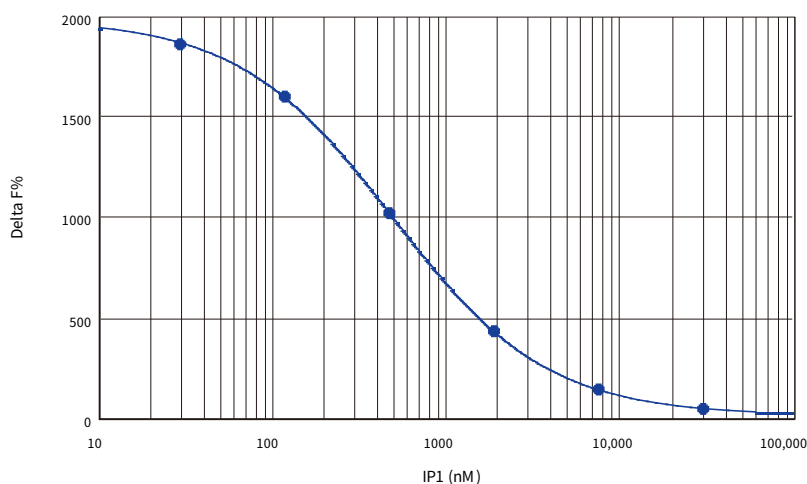


图 4 IP1标准曲线。Z' = 0.84, EC₅₀ = 501 nM, 与产品说明书中给的值比较。

参考

1. TR-FRET Basics (www.htrf.com)
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. *Biomol Scrn* 4(2): 67-73.
3. cAMP dynamic 2 HTRF kit package insert (Cisbio international, France).
4. IP-One HTRF kit package insert (Cisbio international, France).