

## APPLICATION NOTE

# 借助于具有注射器模块的 SpectraMax i3x 实时监测 G 蛋白偶联受体激活过程

## 简介

Gq 蛋白偶联受体激活过程通常借助于具有荧光功能的微孔板读板机来实时监测钙敏感的荧光染料与细胞内钙离子的结合来实现。通常我们会通过微孔板读板机内的自动移液装置将激动剂化合物加到预铺细胞的孔板中，然后读板机检测系统实时监测化合物引起的荧光强度值的变化，对动力学检测结果进行分析，可以得到关于化合物响应曲线的一些信息，其中包括激动剂和拮抗剂的  $EC_{50}$  和  $IC_{50}$  值。

在本篇应用文献中，我们介绍了如何利用配有注射器模块的 SpectraMax<sup>®</sup>i3x 多功能微孔板读板机来对两种不同的细胞系进行钙离子浓度测定。

CHO M 1 WT 3 是采用中国仓鼠卵巢细胞稳定转染 M 1 毒蕈碱的 Gq 受体细胞，1321 N 1 是人星形细胞瘤细胞系具有内源性毒蕈碱胆碱能受体，借助于 SoftMax<sup>®</sup>Pro 软件的数据分析功能精确获得两个细胞系的  $EC_{50}$  和  $IC_{50}$  值，我们与以前使用高通量筛选系统获得的结果进行比较。在软件的 Acquisition Editor 界面下，流程化界面方便我们设置注入器的相应参数 ( 图 1 所示 )。

## 材料

- CHO M 1 WT 3 cells (ATCC cat. # CRL - 1985)
- 1321 N 1 cells (ECACC cat. # 86030402)
- 受体激动剂化合物
- 卡巴胆碱 (carbachol; Sigma cat. # C 4382)
- 乙酰胆碱氯化物 (Sigma cat.# A 6625)

- 拮抗剂化合物
- 阿托品 (Sigma cat. # A 0132)
- FLIPR<sup>®</sup> Calcium 6 Assay Kit (Molecular Devices cat. # R 8190)
- 1 M HEPES (Thermo cat. # 15630 - 080)
- ReadiUse<sup>™</sup> water - soluble probenecid (AAT Bioquest cat. # 20061)
- SpectraMax<sup>®</sup>i3x 多功能微孔板读板机
- SpectraMax 注射器模块
- FlexStation<sup>®</sup>3 多功能微孔板读板机

## 优势

- $EC_{50}$  和  $IC_{50}$  的值与之前发表的高通量筛选系统获得的数值非常接近
- 减少死体积并节省化合物
- 借助于 SoftMax Pro 软件便于实时对细胞进行监测
- 兼容 FLIPR 钙流检测试剂

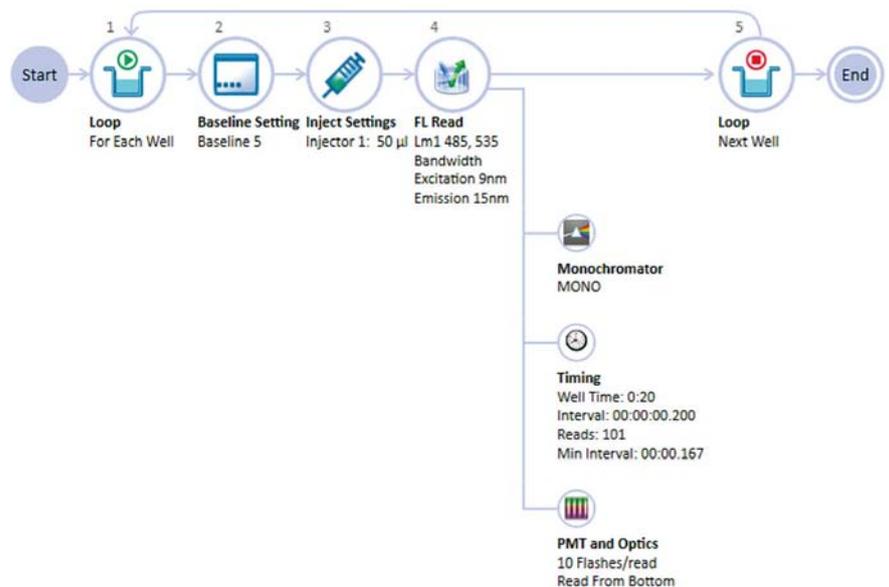


图 1 SpectraMax i3x 多功能微孔板读板机进行钙流检测。SoftMax Pro 软件中 Acquisition Editor 界面下提供了一个流程的图形化流程，可以方便进行设置

## 方法

### 准备细胞

将 CHO M1 WT3 细胞预铺于 96 孔黑色透明底的微孔板中，密度大约每孔 50,000 细胞/100  $\mu\text{L}$ 。5 % 二氧化碳以及 37 摄氏度环境下过夜培养。1321 N1 细胞作为“试验准备”试剂迅速解冻，简而言之，一瓶冻存细胞 (大约 1,000,000 细胞/ml) 在 37 度水浴锅中迅速解冻后用 10 ml 的 DMEM 培养基重悬，细胞以每分钟 1000 转的速度离心 5 分钟后，去除培养基，随后将这些细胞以 300,000 细胞/ml 密度放置于新鲜的 DMEM 培养基中，细胞预铺于黑色底透的 96 孔板中，每孔 30,000 细胞/100  $\mu\text{L}$ ，5 % 二氧化碳以及 37 摄氏度环境下过夜培养。

对于这两种细胞系，第二天，针对预铺的细胞进行钙离子浓度的检测。

### 准备染料

每块微孔板中预铺有细胞的孔中加入 100  $\mu\text{L}$  荧光染料缓冲液，5 % 二氧化碳以及 37 摄氏度环境下培养 2 小时，细胞进行检测前无需清洗。

### 准备化合物

针对激动剂相关检测实验，5 X 的卡巴胆碱 (CHO M1 WT3 细胞) 或乙酰胆碱 (1321 N1 细胞) 工作缓冲液预先配备于实验以前，1:3 比例进行梯度稀释工作缓冲液于 4 ml 聚丙烯试管中。每种化合物制备了 8 种浓度溶液以便于生成相应浓度的效应学曲线。

我们以 1:3 稀释方式制备拮抗剂阿托品溶液，将工作缓冲液加入到检测板的孔中，达到适当的终浓度，微孔板静止平衡 30 分钟，注入器用于将激动剂注入孔中获得  $\text{EC}_{50}$  浓度的值。

### 基于细胞实验的检测设置

利用具有 SpectraMax 注射器模块的 SpectraMax i3x 微孔板读板机获得激动剂的浓度效应学曲线，一次一个化合物的浓度，针对曲线图表中的每条曲线，从低浓度到高浓度稀释以减少交叉感染。注射器 1 预充化合物后，然后将染料注射于

Parameter	Setting
Read type	Flex
Read mode	Fluorescence Bottom read
Wavelengths	Ex 485 nm Em 525 nm Cutoff 515 nm
Sensitivity	Readings: 3 PMT: Medium
Timing	Run time: 90 sec Interval: 2.1 sec
Compound transfer	Initial volume: 150 $\mu\text{L}$ Transfers: 1 Pipette height: 150 $\mu\text{L}$ Volume: 50 $\mu\text{L}$ Rate: 2 Time Point: 19 sec
Triturate	Not used

表 1 FlexStation 3 针对钙流检测的设置

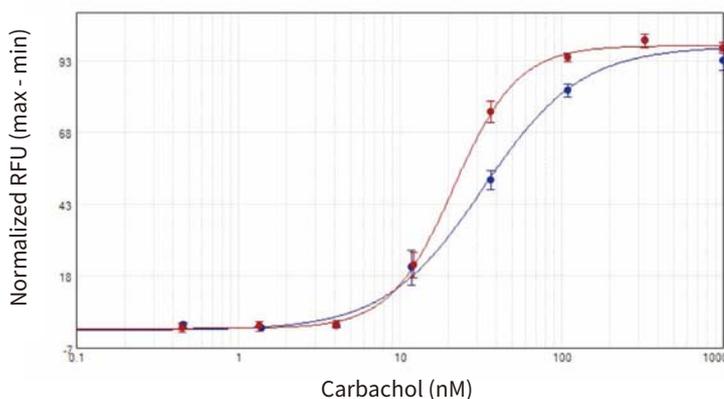


图 2 CHO M1 WT3 细胞中加入激动剂后获得的浓度效应学曲线。在具有注射器模块的 SpectraMax i3x 读板机 (蓝色曲线) 和 FlexStation 3 读板机 (红色曲线) 进行相应检测，获得孔板中细胞在加入卡巴胆碱后钙离子浓度效应学曲线。阿托品拮抗这种激活作用的  $\text{IC}_{50}$  值分别为 0.54 nM 和 1.4 nM (图 3 所示)

细胞板孔中，每组三个重复，随后进行检测。将预先配置好的 5 X 50  $\mu$ L 工作缓冲液加入 200  $\mu$ L 体系的孔中，最终为 1 X 缓冲液浓度。

最后反冲试剂于注入器内，将管路中化合物移除，并注入浓度更高一个级别的化合物溶液。

建立新的微孔板模板，并在新的一块孔板重复的孔上进行针对这个一浓度的检测。针对每个化合物浓度重复这个过程，为每组浓度复制并创建一个新的模板，直到制作完成浓度-响应曲线。

在 SoftMax Pro 的 Acquisition 界面下可以定义仪器和注射器相关设置 (图 1 所示)。

将拮抗剂的梯度稀释液手动加入含有染料的细胞孔中，进行拮抗剂作用效果的研究，平衡 30 分钟左右后，使用具有注射器模块的 SpectraMax i3x 微孔板读板机进行动力学检测并分析，将获得  $EC_{80}$  的激动剂浓度试剂注射到所有的检测孔中。作为对照，在内置多通道自动移液装置的 FlexStation 3 多功能微孔板读板机上对孵育同一染料的孔板进行了检测和分析，FlexStation 3 仪器设置如表 1 所示。

## 结果

在具有注射器模块的 SpectraMax i3x 微孔板读板机，通过使用该模块将每一种化合物稀释溶液注入每个单独的孔板模板的方式进行检测，得到了一系列的激动剂浓度效应学曲线。这些化合物注射原则是从低浓度运行到高浓度，以避免交叉影响的问题。针对拮抗剂检测，其中包括将获得  $EC_{80}$  浓度的激动剂加入到细胞和拮抗化合物的孔中，针对单一孔板方式检测。

激动剂卡巴胆碱可激活表达 M1 毒蕈碱受体的 CHO M1 WT3 细胞， $EC_{50}$  值在 SpectraMax i3x 微孔板读板机上是 32.8 nM，而在 FlexStation 3 微孔板读板机上是 21.7 nM (图 2 所示)。

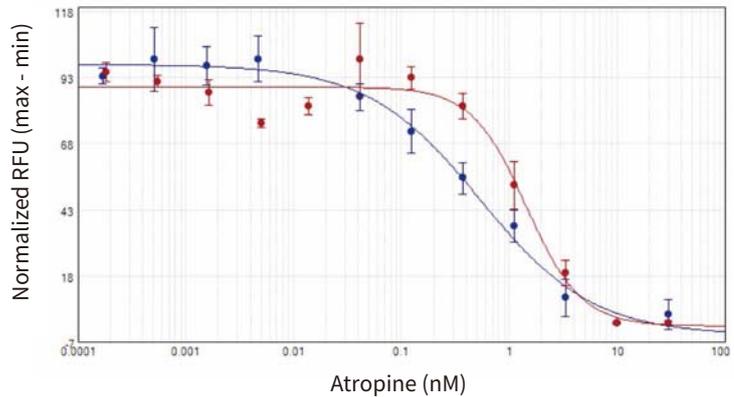


图 3 CHO M1 WT3 拮抗剂的  $IC_{50}$  曲线。在具有注射器模块的 SpectraMax i3x 读板机 (蓝色曲线) 和 FlexStation 3 读板机 (红色曲线) 进行相应检测，加入具有浓度梯度的拮抗剂阿托品于细胞中，并测定  $EC_{80}$  浓度的激动剂卡巴胆碱下的相应浓度效应学变化曲线。表达毒蕈碱型乙酰胆碱受体 (mAChR) 的 1321 N1 细胞被乙酰胆碱激活， $EC_{50}$  值 0.50  $\mu$ M 和 0.24  $\mu$ M (图 4 所示)

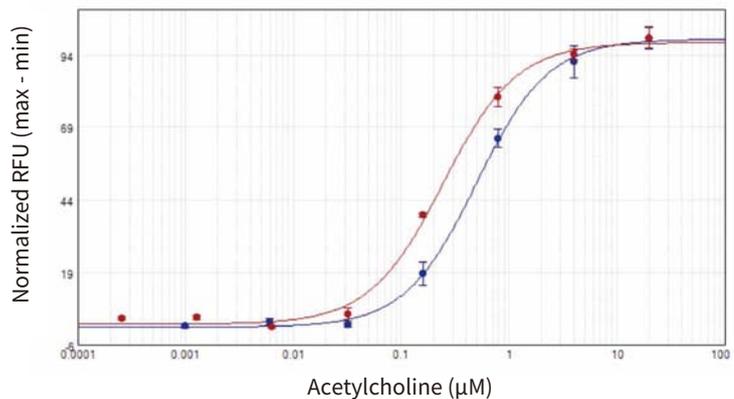


图 4 1321 N1 激动剂浓度效应学曲线。在具有注射器模块的 SpectraMax i3x 读板机 (蓝色曲线) 和 FlexStation 3 读板机 (红色曲线) 进行相应检测，用乙酰胆碱处理细胞，测定细胞对钙的反应学曲线变化。阿托品拮抗作用后，获得  $IC_{50}$  值为 0.24 nM 和 0.62 nM (图 5 所示)

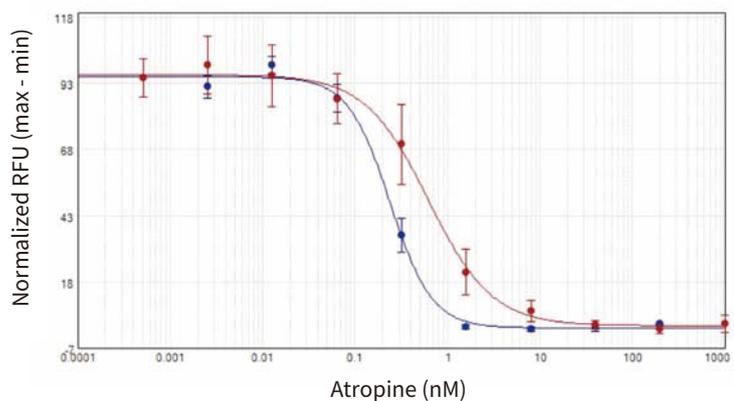


图 5 1321 N1 受体拮抗剂  $IC_{50}$  曲线。在具有注射器模块的 SpectraMax i3x 读板机 (蓝色曲线) 和 FlexStation 3 读板机 (红色曲线) 进行相应检测获得结果，加入具有浓度梯度的拮抗剂阿托品于细胞中，并测定  $EC_{80}$  浓度的激动剂乙酰胆碱下的相应浓度效应学变化曲线。表 2 显示两种细胞系的浓度效应学曲线

## 结论

使用具有 SpectraMax 注入器模块后，我们获得了相应的浓度效应学曲线， $EC_{50}$  和  $IC_{50}$  的值与之前发表的高通量筛选系统获得的数值非常接近。使用 SoftMax 软件的 Acquisition 界面下可以方便地进行相应参数的设置，实时监测每孔获得数值。我们发现使用具有注射器模块的 SpectraMax i3x 读板机或得的结果与之前使用 FlexStation 3 读板机和 FLIPR Tetra® 高通量筛选系统获得的结果非常一致。

		SpectraMax i3x reader	FlexStation 3 reader
Agonist $EC_{50}$	CHO M1WT 3 carbachol	32.8 nM	21.7 nM
	1321 N 1 acetylcholine	0.54 nM	1.4 nM
Antagonist $IC_{50}$	CHO M 1 WT 3 atropine	0.50 nM	0.24 nM
	1321 N 1 atropine	0.24 nM	0.62 nM

表 2 如在具有注射器模块的 SpectraMax i3x 读板机和 FlexStation 3 读板机进行相应检测获得  $EC_{50}$  值和  $IC_{50}$  值获得结果所示



更多精彩内容  
尽在官方微信

### 美谷分子仪器 (上海) 有限公司

全国咨询服务热线: 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 公爵大厦 21 楼

