

APPLICATION NOTE

在 FlexStation 3 读板机上使用冷冻 CHO 细胞优化毒蕈碱 M₃ 受体检测

简介

基于细胞的检测往往具有挑战性和耗费时间。为了促进和简化这一复杂的过程，冷冻细胞，可以在没有事先培养的情况下进行检测，已经成为一种适合和经常使用的替代细胞在持续生长的培养方式。冷冻细胞使细胞培养与功能测试分离，有助于减轻生物变异性，提高孔板与孔板之间的一致性和数据保真度，增加测定时间的灵活性，显著降低细胞培养成本。

FLIPR® Calcium 5 检测试剂盒 (图 1) 比其他“免洗”钙试剂表现出更好的性能，并具有广泛的适用性，适用于各种生物靶点的选择。消除通常的洗涤步骤具有减少孔板处理和更快的检测通量的关键优势。此外，在次最优分析条件下，使用均相实验具有增强数据质量和降低孔间变异性的潜力。

FlexStation® 3 多功能微孔板读板机通过直接将试剂从源孔板转移到读数孔板，为基于分液器的系统提供了更多的灵活性，从而减少了试剂和耗材的消耗。确定单个试剂和浓度的能力可以在单个实验中探索更多的检测条件，并使该系统成为激动剂和拮抗剂研究的理想选择。

在本应用文献中，我们利用 FlexStation 3 读板机在具有代表性的 G_q-GPCR 检测中比较不同的 Ca²⁺ 指标 (包括单波长和双波长)，以突出使用均相的“免洗”钙试剂的潜在优势。此外，我们还比较了连续培养中的细胞和用冷冻试剂制备的细胞 (从 European Collection of Cell Cultures (ECACC) 中获得的“检测就绪”细胞) 之间的检测性能和数据保真度。

优势

- 多用途检测在多种生物靶标上具有广泛的适用性
- 均相格式减少了孔板处理并提供了更高的通量
- 多通道液体处理使激动剂和拮抗剂的研究易于建立

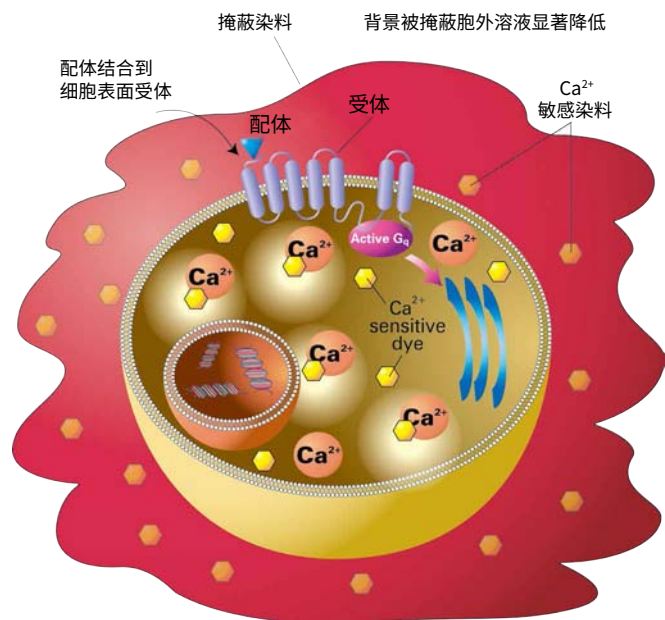


图 1. FLIPR Calcium 检测原理。 FLIPR Calcium 检测试剂盒包括一种钙敏感染料，在培养过程中被摄入细胞质中。试剂盒的掩蔽染料留在细胞外，阻挡背景荧光。配体与受体结合后，钙被释放到细胞质中。染料与细胞内的钙结合，产生荧光。

材料和方法

- FlexStation 3 多功能微孔板读板机 (Molecular Devices)
- AquaMax® 4000 微孔板洗板机, 安装有 96 孔洗头 (Molecular Devices)
- ImageXpress® Micro 宽场高内涵筛选系统 (Molecular Devices)
- FLIPR Calcium 5 Assay Explorer 试剂盒 (Molecular Devices, Cat. #R8185)
- Fluo-4 AM (Invitrogen, Cat. #F-14201)
- Fura-2 AM (Invitrogen, Cat. #F-1221)
- DAPI 核酸染料 (Invitrogen, Cat. #D-1306)
- 冷冻保存的表达人毒蕈碱 M₃ 受体的“检测就绪” CHO 细胞 (CHRM3, ECACC, Cat. #10031603)
- 水溶性丙磺舒 (Invitrogen, Cat. #P-36400)
- CHO 细胞生长培养基: 含有 10% FBS 和 1% pen/strep 的 Hams F12: DMEM 培养基 (Invitrogen, Cat. #31331-093, 16140-071 and 15140-122)
- 含有钙离子和镁离子以及 20 mM HEPES 的 Hanks 平衡盐溶液 (HBSS) (Invitrogen, Cat. #14025-050 和 15630-056)
- 细胞培养板 (黑壁、底透 96 孔 CellBIND 微孔板, Corning, Cat. #3340)
- 乙酰胆碱, 非选择性毒蕈碱受体激动剂 (ACh, Sigma, Cat. #A6500)
- 对氟六氢-西拉-二芬尼多盐酸盐 (p-Fluorohexahydro-sila-difenidol Hydrochloride), 毒蕈碱受体拮抗剂 (p-F-HHSiD, Sigma, Cat. #H127)
- 甲醇 (Sigma, Cat. #179337)

方法

细胞处理和接种方法

1. 连续培养的表达式毒蕈碱 M₃ 受体 (CHRM3) 的 CHO 细胞在 200 μ L 生长培养基中以 30,000 细胞 / 孔接种, 在实验台室温下维持 30 分钟, 然后 37°C、95% 湿度和 5% CO₂ 下孵育过夜。

2. “检测就绪”冻存的 CHRM3 细胞在 37°C 水浴下快速解冻, 轻轻转移到 10 mL 温暖的生长培养基中并以 1000 rpm 离心 5 分钟。细胞重悬于生长培养基中并以 50,000 细胞 / 孔接种于 200 μ L 培养基中, 孔板留在实验台室温下 30 分钟, 之后再 37°C、95% 湿度和 5% CO₂ 下孵育 18 小时。

3. 冻存的 CHRM3 细胞在 37°C 水浴下快速解冻, 轻轻转移到 10 mL 温暖的生长培养基中并以 1000 rpm 离心 5 分钟。细胞重悬于 10 mL 温暖的生长培养基中, 然后放回 CO₂ 孵箱中孵育 60 分钟。接着离心后的细胞重悬于 FLIPR Calcium 5 检测试剂中并以 75,000 细胞 / 孔接种在 100 μ L 上样缓冲液 (loading buffer) 中。最后, 细胞板用 1000 rpm 离心 (没有停转) 再在 CO₂ 孵箱孵育 45 分钟。

FLIPR Calcium 5 检测试剂上样

染料上样缓冲液的制备是通过将一小管染料的完全溶解, 使最终体积为 20 mL 的 Hanks 平衡盐溶液 (Hanks Balanced Salt Solution), 用 20 mM HEPES、2.5 mM 丙磺舒调节至 pH 7.4。用细胞制备方法 (1) 和 (2) 制备的细胞板, 从孵箱中取出, 移去生长培养基并加入 100 μ L 染料上样缓冲液到各个孔。染料上样板在 37°C、5% CO₂ 下孵育 45 分钟并允许在检测前室温下平衡 15 分钟。染料上样后不用洗涤且每孔的初始检测体积为 100 μ L。

Fluo-4 AM 和 Fura-2 AM 染料上样

根据上述方法 (2) 制备的细胞用 100 μ L / 孔的 Fluo-4 AM 或 Fura-2 AM (2.5 μ M 中加入 2.5 mM 丙磺舒) 在 37°C 下孵育 45 分钟, 接着吸去生长培养基。然后在安装有 96 孔细胞洗头的 AquaMax 4000 微孔板洗板机上用加有 2.5 mM 丙磺舒的 HBSS 缓冲液洗涤细胞板。洗涤程序包括了一系列程序化的吸液和分液步骤 (表 1)。

在 ImageXpress Micro 系统上进行细胞数量确认

为了染料对比测试来验证细胞数量和融合度, 用上述细胞方法 (2) 制备的培养板用 DAPI 核酸染料染色, 在 ImageXpress Micro 宽场高内涵筛选系统上成像。简而言之, 制备不同密度的细胞并在 37°C、95% 湿度和 5% CO₂ 下孵育 18 小时。去除生长培养基, 代之以 100 μ L 每孔的冰冷甲醇。5 分钟后移去甲醇, 加入 100 μ L 每孔的 DAPI 溶液 (300 nM), 孵育 5 分钟后用 HBSS 清洗三次。接下来用 4X 物镜对细胞单层成像以测量整孔面积, 用 MetaXpress® 软件的 Count Nuclei Application Module (核计数应用模块) 得出每孔总细胞数。

细胞优化实验

为比较三种不同的细胞处理方法, 乙酰胆碱 (ACh) 激动剂响应曲线和 p-F-HHSiD 拮抗剂抑制曲线以定性和定量方式进行比较。在染料孵育和室温平衡后, 在室温下进行钙动员检测。在 3X 终浓度下、HBSS 缓冲液和 96 孔聚丙烯孔板中制备乙酰胆碱 (ACh) 稀释系列 (检测浓度 0.03 nM–300 nM), 以 50 μ L / 孔加入到细胞板的各个孔中以刺激胞内 Ca²⁺ 的释放。

对于拮抗剂的研究, 以 3X 浓度制备 p-F-HHSiD 并离线加入 15 分钟后添加 50 μ L 4X 浓度的 ACh (EC₈₀)。

在化合物添加前、中、后检测荧光 90 秒。

步骤	动作	设置
1	Aspirate	Rate = 5, Descent speed = Fast, Dwell time = 2.0 sec., Probe height = 1.0, 2.0, or 3.0 mm
2	Dispense	Rate = 1 or 2, Volume = 300 μ L
3	Aspirate	(Same as Step 1)
4	Repeat	1 time from Step 2
5	Dispense	Rate = 1 or 2, Volume = 300 μ L
6	Aspirate	Rate = 5, Descent speed = Fast, Dwell time = 2.0 sec., Probe height = 4.5 mm

表 1 CHRM3 细胞钙流检测中的 AquaMax 4000 微孔板洗板机参数。

钙指示剂对比实验

在 FlexStation 3 读板机上用 ‘Flex’ 读数模式测定钙流。加入了 FLIPR Calcium 5 检测试剂、Fluo-4 AM 或 Fura-2 AM 的细胞，用整合了 8 通道移液器的 FlexStation 3 读板机以不同浓度 ACh (20 pM 到 8 μM, 5 倍稀释) 对细胞进行挑战。用优化后的参数在化合物添加前、中、后测定荧光 90 秒 (表 2)。

对于拮抗剂的研究, p-F-HHSiD 手工添加到合适的孔中并允许平衡 15 分钟再将孔板放入 FlexStation 3 中。仪器中的机载移液系统用于 50 μL/ 孔的 ACh 分液 (EC₈₀ 浓度), 与此同时实时监测荧光的变化。

数据分析

以峰值荧光强度 (FLIPR Calcium 5 检测试剂或 Fluo-4 AM) 或 Fura-2 AM 的最大 340/380 nm 比值作为测定的响应。为了让对比简单, 数据在基线上归一化为 % 响应, 表示为 mean ± s.e.m, n ≥ 4。

每组的浓度 - 效应曲线都拟合四参数方

$$E = \beta + \frac{(\alpha - \beta) [A]^n}{[EC_{50}]^n + [A]^n}$$

这里 a、b、EC₅₀ 和 n 分别是上渐近线、下渐近线、定位 (EC₅₀/IC₅₀) 和斜率参数。所有的常规曲线拟合均由 SoftMax Pro 6 软件计算得到。

Z' 因子使用以下方程计算:

$$Z' = 1 - \frac{(3\sigma^+ + 3\sigma^-)}{|\mu^+ - \mu^-|}$$

这里 σ⁺ 表示阳性对照的标准差, σ⁻ 表示阴性对照的标准差。|μ⁺ - μ⁻| 表示阳性对照信号平均值与阴性对照信号平均值之差的绝对值。Z' 因子 > 0.5 说明在阴性对照和阳性对照之间有一个很大的分离带, 因此, 是一个可靠的实验。¹

结果

细胞优化实验

在所有三种细胞制备方法下, 负载 FLIPR Calcium 5 检测试剂盒的 CHR3 细胞² 显示出强大的荧光增加, 以响应 ACh 的应用 (图 2)。

计算出的 ACh 的 EC₅₀ 值在彼此 0.5 log 单位内 (表 3), 然而, 当直接从冷冻细胞中使用细胞时, EC₅₀ 值有显著的 (P < 0.05) 右旋偏移 (图 3)。同样, 三种细胞

参数	设置		
	Calcium 5	Fluo-4 AM	Fura-2 AM
Read type	Flex		
Read mode	Fluorescence, bottom read		
Ex wavelength	485 nm	485 nm	340/380 nm
Em wavelength	525 nm	525 nm	510 nm
Cut-off	515 nm	515 nm	None
Run time	90 sec.		
Interval	1.6 sec.	1.6 sec.	3.5 sec.
化合物添加			
Initial volume	100 μL		
Pipette height	65 μL		
Volume	50 μL		
Rate	4 (64 μL/s)		
Time point	20 sec.		

表 2 使用 FlexStation 3 读板机在 CHR3 细胞中进行钙染料对比的 SoftMax Pro 软件优化设置。

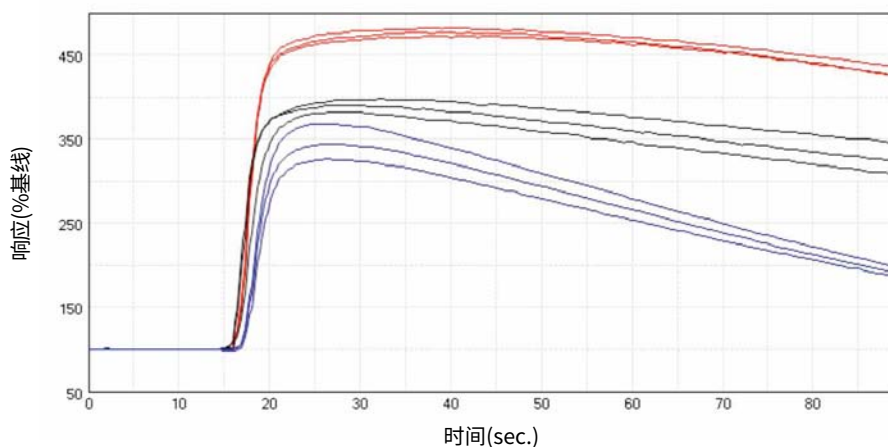


图 2 动力学追踪。加入了 FLIPR Calcium 5 试剂并以 ACh (300 nM) 处理细胞, 由 SoftMax Pro 6 导出的具有代表性的动力学追踪, 在 FlexStation 3 读板机上。所展示的细胞处理条件为 (●) 连续培养的细胞, (●) 冷冻细胞解冻后使用 18 小时或 (●) 来自冷冻细胞。曲线图显示了 y 轴为超过基线的 % 响应对 x 轴为时间秒。

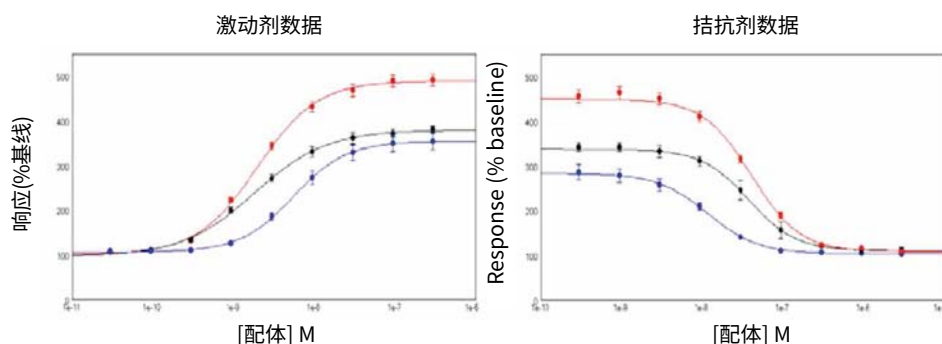


图 3 激活 / 抑制曲线。CHR3 细胞加入 FLIPR Calcium 5 检测试剂用 ACh ± p-F-HHSiD 处理的激活 / 抑制曲线。测试的细胞处理条件为 (●) 连续培养的细胞, (●) 冷冻细胞解冻后使用 18 小时或 (●) 来自冷冻细胞。

制备方法对 p-F-HHSiD 的 IC_{50} 估值也相似。连续培养和冷冻细胞使用 18 小时的 Z' 估值大于直接使用冷冻细胞获得的 Z' 估值。

根据 EC_{50} 的估值、更大的信号幅度和这些初步研究的 Z' 值的提高、更容易的细胞制备和更低的消耗成本，随后的所有实验都是在接种后 18 小时使用的冷冻细胞中进行的 (方法 2)。

ImageXpress Micro 系统上的细胞数确认
为了经验性地验证细胞数和融合度，根据细胞制备方法 (2) 制备了两种具有代表性的细胞板。第二天，用 DAPI 核酸染料染色。孔板放置于 ImageXpress Micro 宽场高内涵筛选系统上进行成像 (图 4)。

在这一系列实验中，给出一致单层的最佳细胞密度被确定为 50,000 个细胞 / 孔 (表 4)。然后，这种细胞密度被用于所有随后的实验。

钙指示剂比较实验

用 FLIPR Calcium 5 检测试剂盒、Fura-2 AM 和 Fluo-4 AM 分别负载的细胞，ACh 在 CHRM3 细胞中产生细胞内 Ca^{2+} 的浓度依赖性增加 (图 5)。

单向方差分析 (ANOVA) 表明，Fluo-4 AM 和 Fura-2 AM 数据集的 EC_{50} 估值没有显著差异 (P value = 0.92)。

然而，FLIPR Calcium 5 检测试剂盒有一个显著的 ($P < 0.05$) 的 EC_{50} 值的左移，更高的 Z' 值和更大的响应 / 基线值 (表 5)，表明这种“免洗”方法是更理想的。

相比之下，p-F-HHSiD 数据表明，计算出的 pIC_{50} 值之间的差异可以忽略不计，表明拮抗剂结合不受不同测定制备方法的显著影响 (表 5)。

筛选系数窗口 (Z' 因子) 反映了信号的动态范围和测定的数据变化，采用缓冲液加入 (阴性对照) 和 ACh (激动剂阳性对照) 的 EC_{80} 浓度计算。筛选系数窗口 (Z' 因子)，它反映了信号的动态范围和测定的数据变化，使用缓冲液添加 (阴性对照) 和 ACh (激动剂阳性对照) 的 EC_{80} 浓度计算。三种染料的 Z' 因子均 > 0.5 (表 5)。这表明阴性对照和阳性对照之间有一个很大的分离带，并且是重复性和高质量的实验方法。然而，FLIPR Calcium 5 检测试剂盒的数据始终比其他 2 个钙指示剂产生更高的 Z' 值，并且明显有更高的响应 (% R/B)。

总结

FlexStation 3 读板机与 FLIPR Calcium

	培养中的细胞			18 小时后冷冻细胞			冷冻的细胞		
	EC_{50}/IC_{50}	% R/B	Z'	EC_{50}/IC_{50}	% R/B	Z'	EC_{50}/IC_{50}	% R/B	Z'
ACh	1.9×10^9 M	378	0.61	2.5×10^9 M	501	0.78	6.3×10^9 M	352	0.41
p-F-HHSiD	3.6×10^8 M	341	0.57	3.7×10^8 M	450	0.81	4.9×10^8 M	286	0.24

表 3 三种不同细胞处理条件下 FLIPR Calcium 5 检测试剂盒负载 CHRM3 细胞的比较结果。*

*注意，使用 EC_{80} 响应计算激动剂数据的 Z' 估计值。通过计算高于基线的峰值响应，得到超过基线的 % 响应 (% R/B) 参数，基线设置为 100% 响应。

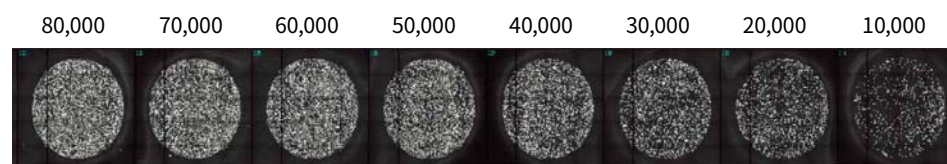


图 4 细胞密度。通过在 ImageXpress Micro 宽场高内涵筛选系统获得的代表性细胞密度图像。在每个有代表性的孔上以数字表示最初细胞接种密度。

接种密度 (每孔细胞)	18 小时后细胞数 (每孔平均细胞)
80,000	71,935
70,000	64,496
60,000	58,209
50,000	53,374
40,000	44,002
30,000	34,348
20,000	24,515
10,000	14,482

表 4 CHRM3 细胞通过 DAPI 染色获得的细胞密度结果。使用 MetaXpress 软件的核计数应用模块 (Count Nuclei Application Module) 分析数据。

	FLIPR Calcium 5 检测试剂			Fluo-4 AM			Fura-2 AM		
	EC_{50}/IC_{50}	% R/B	Z'	EC_{50}/IC_{50}	% R/B	Z'	EC_{50}/IC_{50}	% R/B	Z'
Acetylcholine	3.1×10^9 M	485	0.81	7.9×10^9 M	294	0.58	8.7×10^9 M	215	0.63
p-F-HHSiD	2.3×10^8 M	377	0.87	2.0×10^8 M	240	0.72	2.1×10^8 M	174	0.78

表 5 负载了三种不同钙指示剂的 CHRM3 细胞在 FlexStation 3 读板机上的结果 ($n \geq 6$)。

5 检测试剂盒已被证明能最佳地测定表达毒蕈碱 M₃ 受体的“检测就绪”冷冻 CHO 细胞中细胞内 Ca²⁺ 的变化。双单色器有助于最佳激发和发射波长的选择，并允许同时使用单波长和双波长比例指示器。

最近出现的冷冻细胞作为可行的分析试剂，进一步简化了分析的发展和筛选过程，我们成功地证明了冷冻细胞与细胞在持续培养中的数据质量优势。使用冷冻细胞的额外好处包括大幅节省消耗品、生长培养基和 FTE 资源。

与以前在前一代 FlexStation 读板机上进行的类似实验进行的比较表明，在 FlexStation 读板机上，细胞是手动清洗的，这表明使用 Aquamax4000 细胞洗板机可以有助于提高检测质量。

此外，我们还展示了对 FlexStation 3 读板机的简单检测优化，以及用“免洗”试剂，如 FLIPR Calcium 5 检测试剂盒促进数据保真度的提高。

参考文献

1. Zhang, J-H., Thomas, T.D.Y. and Oldenburg, K. R. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Screen.*, 4, 67-73.

2. Schucht, R., Lydford, S., Andzinski, L., Zauers, J., Cooper, J., Hauser, H., Wirth, D. and May, T. (2011). Rapid Establishment of G-Protein-Coupled Receptor-Expressing Cell Lines by Site-Specific Integration. *J Biomol Screen.*, 16, 323-331.



更多精彩内容
尽在官方微信

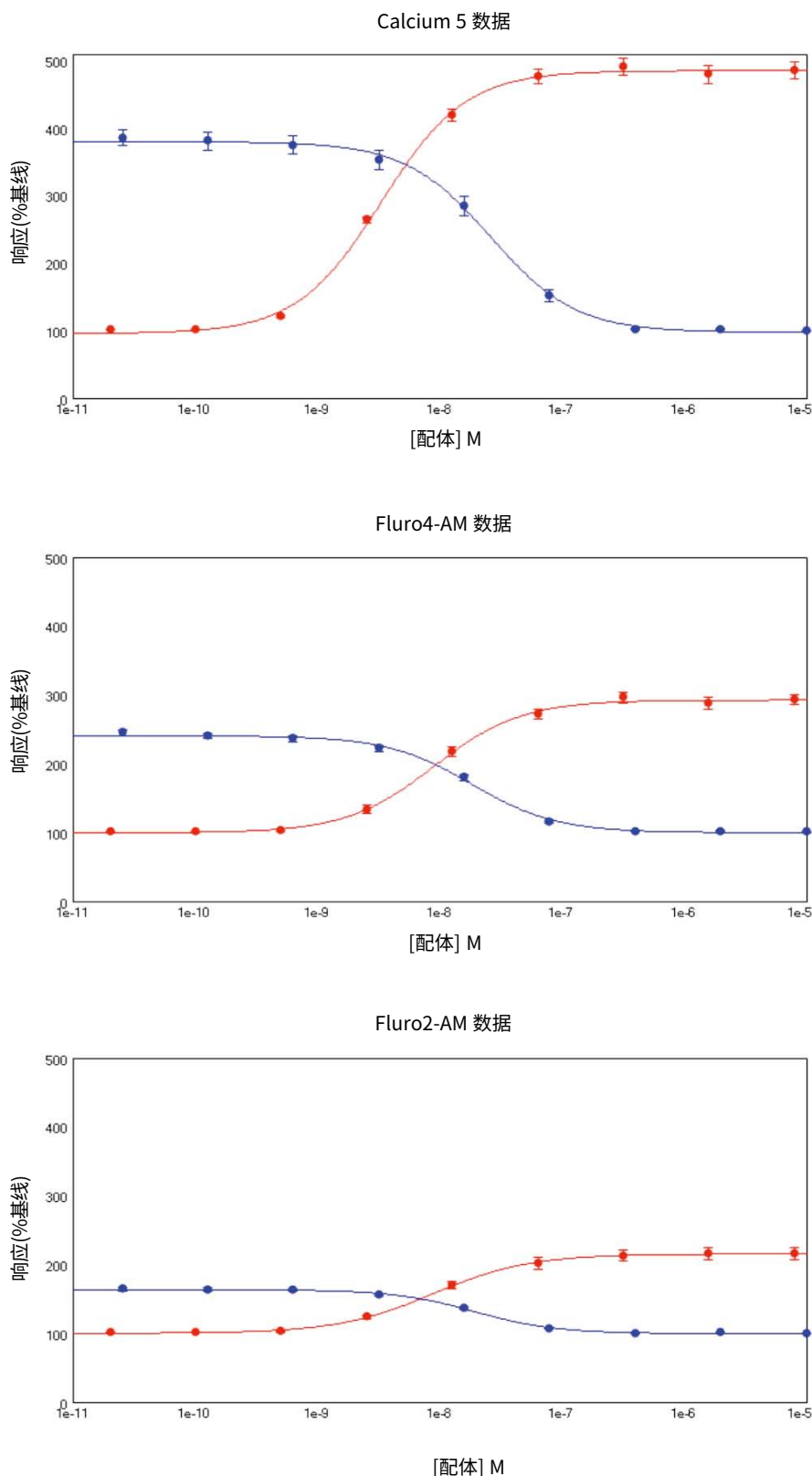


图 5 Calcium 5 检测试剂盒数据。SoftMax 6 Pro 软件曲线图展示 ACh (●) 或 p-F-HHSiD (●) 浓度 (x 轴) 对应信号的 % 变化 (y 轴) 为负载了 FLIPR Calcium 5 检测试剂、Fluro-4 AM 和 Fura-2 AM 的细胞。数据为 mean ± s.e.m。

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

