

APPLICATION NOTE

如何在 SpectraMax 多功能微孔读板机上进行 IMAP 磷酸二酯酶检测

简介

Molecular Devices 的 IMAP® 技术能对激酶、磷酸酶和磷酸二酯酶进行快速、均质和非放射性的分析，非常适用于分析开发和高通量筛选。IMAP 检测是基于磷酸基团与固定在纳米微粒表面的三价金属阳离子之间的高亲和力结合。可以使用 FP 与 TR - FRET 两种读数方法来检测磷酸化底物与纳米微粒相互的结合情况。在 FP 方法中，当 IMAP 结合溶液与磷酸化底物结合时，肽的分子运动被改变，引起标记在肽上的荧光分子的荧光偏振效应 (FP) 增加 (图 1, 左)。在 TR - FRET 方法中，当存在磷酸化的荧光底物时，铽 (Tb) 供体能够与底物荧光受体发生荧光能量转移 (图 1, 右)。该方法使用时间分辨荧光 (TRF) 检测模式，能够消除了测定组分或筛选中化合物的荧光干扰，并且底物尺寸和浓度的选择更灵活。

环核苷酸磷酸二酯酶 (PDEs) 是一组可降解 cAMP 和 cGMP 的磷酸二酯键的酶，是参与各种生物过程的第二信使。由于它们在心脏病，痴呆症，抑郁症等领域具有很现实的临床意义，已成为一类药物治疗的靶标分子。

在本应用文章中，我们使用 IMAP 技术进行 PDE 酶稀释实验和生成抑制曲线，实验能在 SpectraMax®Paradigm®，

SpectraMax®M 5 和 FlexStation®3 多功能读板机上完成，结合 SoftMax®Pro 软件进行获取和分析数据。

材料

- IMAP FP PDE 评估试剂盒 (Molecular Devices P/N R 8175)
- IMAP TR - FRET PDE 评估试剂盒 (Molecular Devices P/N R 8176)
- IMAP 结合试剂
- IMAP 结合缓冲液 A (5x)
- IMAP 结合缓冲液 B (5x)
- TR - FRET Tb 供体
- IMAP 反应缓冲液含 0.01 % 吐温 - 20 (5X)
- 荧光素标记的 cGMP 底物 (Molecular Devices P/N R 7507)
- 牛脑特异性磷酸二酯酶 1, 3', 5' - 环核苷酸 (Sigma P/N P 9529)
- 钙调蛋白 (Sigma P/N P 1431)
- 氯化钙 (主要实验室供应商)
- DL - 二硫苏糖醇 (DTT) (主要实验室供应商)
- 384 孔聚苯乙烯黑色微孔板 (用于 FP) 和白色微孔板 (用于 TR - FRET) (例如，康宁 P/N 3573 和 3572)

优势

- 无需抗体
- 检测灵敏度和稳定性高
- 完整，均相的检测系统
- 提供 FP 和 TR - FRET 两种检测方法

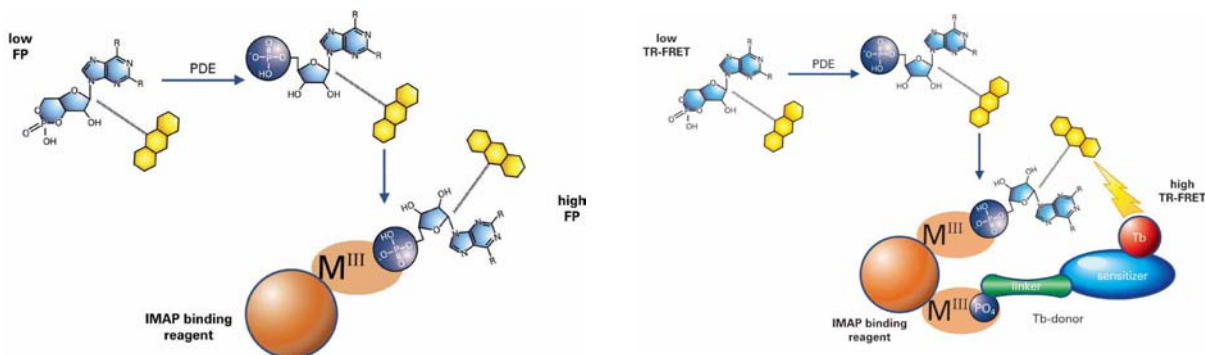


图 1 IMAP FP 和 TR - FRET 磷酸二酯酶检测原理。 使用荧光标记的底物进行磷酸二酯酶反应，然后加入含有大分子 M (III) 纳米颗粒的结合溶液。在 FP 读数 (左) 中，小磷酸化荧光底物与大纳米颗粒结合，这降低了底物的旋转速度并因此增加了其荧光偏振。在 TR - FRET 读数 (右) 中，磷酸化底物和 Tb 供体均与纳米颗粒结合，使 Tb 供体与底物上的荧光素受体紧密接近，进而产生 FRET 效应。

方法

酶稀释

1 mM DTT, 2500 U/mL 钙调蛋白和 2.5 mM 氯化钙制备成完全反应缓冲液 (CRB)。荧光素标记的 cGMP 底物以 CRB 稀释成浓度为 200 nM (2 X) 的工作液。先前确定了最佳底物浓度和其它检测参数 (IMAP Assay Archive)。起始浓度为 0.002 U/mL 的 PDE 1 酶用 CRB 按 1 : 3 的比例稀释, 制成 2 x 的酶稀释液。在黑色 (FP) 或白色 (TR - FRET) 的 384 孔板中加入以下溶液, 每孔总体积 20 μ L:

- 10 μ L 2 X 酶稀释液或无酶 (CRB)
- 10 μ L 2 X 底物溶液

向孔中加入 20 μ L CRB, 作为空白对照。然后将检测板放于在室温下, 酶反应 1 小时。

抑制剂检测

PDE 1 抑制剂 8 - MM - IBMX 和扎普司特用 CRB 连续稀释, 制成 4 x 工作溶液。

两个抑制剂均以初始浓度 200 μ M 进行 1 : 3 的连续稀释。

制备 EC_{50} 浓度为 1.3×10^{-4} U / mL 的 PDE 1 酶作为 4 X 工作溶液。

将以下体积的反应溶液加入微孔板:

- 5 μ L 的 4 X 抑制剂或 CRB 用于对照
 - 5 μ L 的 4 X 酶
 - 10 μ L 的 2 X 底物溶液
- 然后在室温下温育 1 小时。

结合反应

制备不同检测方法使用的 IMAP 结合溶液。

FP 检测: 结合溶液包括 75 % 缓冲液 A, 25 % 缓冲液 B 和 1 : 600 结合试剂。

TR - FRET 检测: 结合溶液包括 60 % 缓冲液 A, 40 % 缓冲液 B, 1 : 800 结合试剂和 1 : 400 Tb 供体。不包含 Tb 供体的结合溶液作为空白对照。

微孔板每孔加入 60 μ L 适当的结合溶液, 然后温育 1 小时 (FP) 或过夜 (TR - FRET)。

检测

结合反应完成后, 把微孔板放入 SpectraMax i3 和 SpectraMax Paradigm 多功能微孔读板机中, 按照表 1 中的参数设置读取检测板, 然后 SoftMax Pro 软件获取和分析所有数据。也可以使用软件中内置的 FP 和 TR - FRET 分析方案来优化您的实验设置和分析参数, 简化实验结果的计算。如果想得到更高精度的读数, 在读取板之前运行读取高度优化程序, 确保每次检测的最佳读取高度。

| 参数 | 荧光偏振 | TR-FRET |
|----------------|--------------------------------------|---|
| 读数类型 | 终点法 | 终点法 |
| 读数模式 | FP | TR - FRET |
| 检测卡盒 | FP-FLUO Ex 485 nm/Em 535 nm | TR-FRET B/G (定制) 波长 1: Ex 340 nm/Em 490 nm 波长 2: Ex 340 nm/Em 520 nm |
| 板子类型 | Costar 384 孔黑板 | Costar 384孔黑板 |
| 读数区域 | 自定义 | 自定义 |
| PMT and Optics | 累计时间: 100 毫秒 顶部读数 读取高度 4.27 毫米 | 累计时间: 1 毫秒 激发时间: 0.05 毫秒 脉冲数: 100 检测延迟: 0.2 毫秒 顶部读数 读取高度 6.02 毫米 |

*SoftMax Pro 软件中的黑板和白板的选项是相同的

表 1 用于 IMAP PDE 检测的 SpectraMax i3 酶标仪的参数设置。

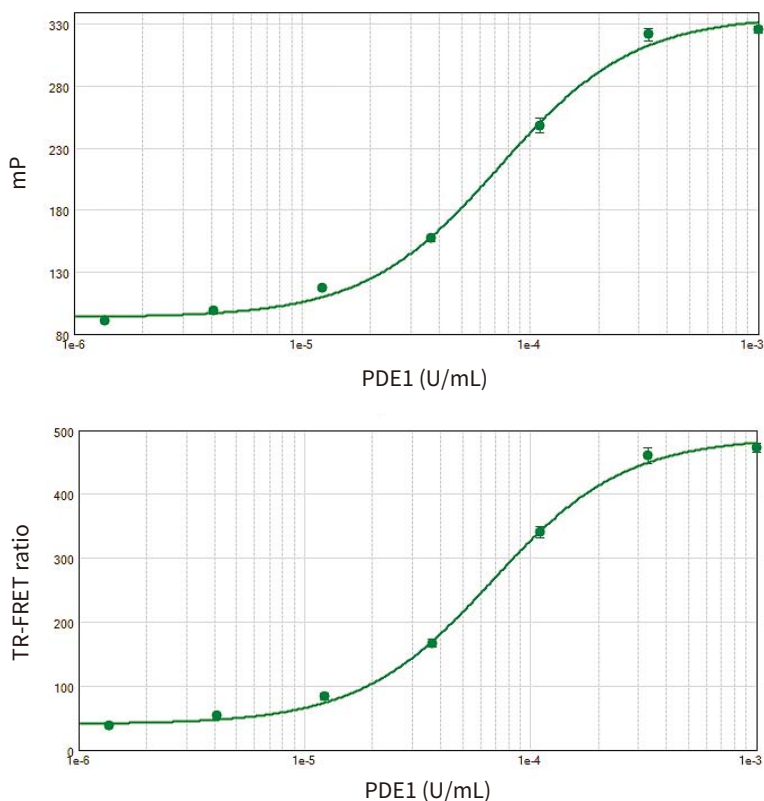


图 2 IMAP FP 和 TR - FRET 读数的 EC_{50} 曲线。上图: FP; EC_{50} 值为 7.3×10^{-5} 单位 / mL, Z' 因子为 0.95。下图: TR - FRET; EC_{50} 值为 6.8×10^{-5} 单位 / mL, Z' 因子为 0.92

结果

酶稀释检测验证了酶的活性和实验灵敏度，获得的酶 EC_{80} 浓度用于抑制剂筛选检测。

分别在 FP 和 TR - FRET 检测模式中使用 IMAP 技术进行 PDE 1 酶稀释。两种检测方法的 EC_{50} 值非常接近 (图 2) 并且与之前公布的数值一致。

在每个检测方法中，由阳性和阴性对照计算的 Z'因子均大于 0.9，这表明 IMAP 技术适合于高通量筛选的稳健性能。在 FP 和 TR - FRET 读数方法中，两种抑制剂检测获得了相似的 IC_{50} 值 (图 3)。

结论

IMAP 技术提供了一种均相的，非抗体的检测平台，用于筛选激酶，磷酸酶和磷酸二酯酶。稳定的荧光信号，可靠的高质量数据，出色的 Z'因子，这些特点表明 IMAP 技术非常适用于高通量的抑制剂筛选。与其它检测方法不同，IMAP 检测采用直接结合，得到更相关的结果。IMAP TR - FRET 检测还可以直接测定 K_m 。

本文章中的数据是由 SpectraMax i3 多功能微孔读板机生成的。SpectraMax Paradigm 获得了相似的结果，除此之外，它还具备快速双 PMT 检测的附加优势。SoftMax Pro 软件数据库中内置的分析方案，简化了从数据采集到分析的工作流程。Molecular Devices 提供完整的 IMAP 技术筛选解决方案，如 IMAP 实验方案，包括 120 多种不同酶的参考数据，经过验证的实验方案以及试剂盒和底物。

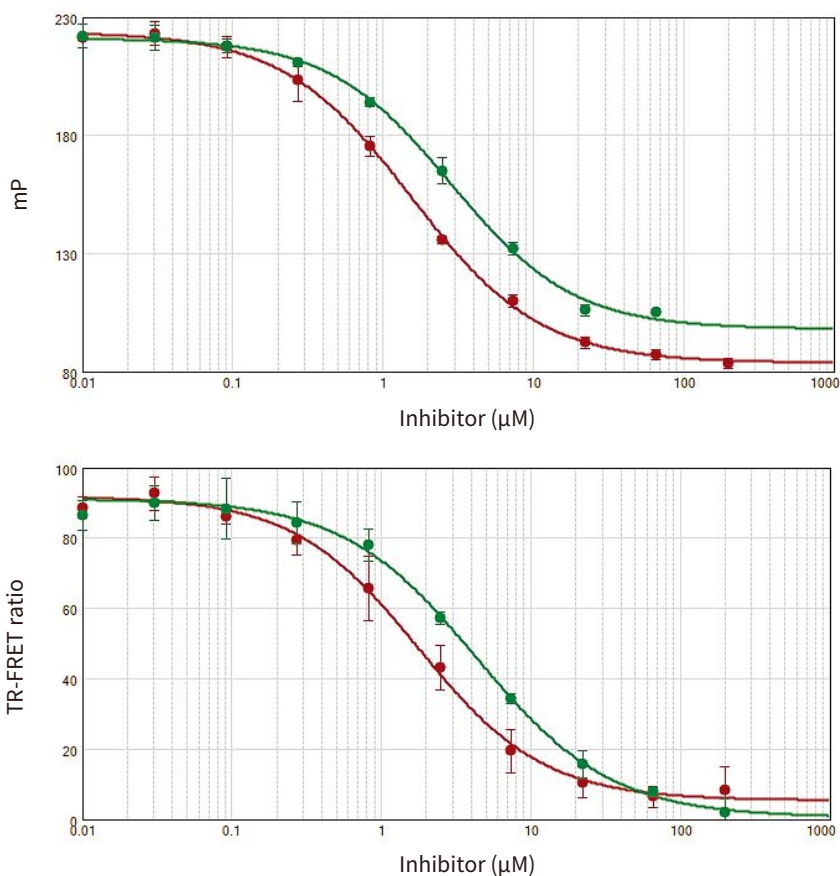


图 3 IMAP FP 和 TR - FRET 读数的 IC_{50} 曲线。上图：FP，下图：TR - FRET。在每个图上，IBMX 的 IC_{50} 曲线为红色，扎普司特曲线为绿色。8 - MM - IBMX: IC_{50} 值为 1.55 μM (FP) 和 1.77 μM (TR - FRET)。Zaprinast: IC_{50} 值为 2.83 μM (FP) 和 4.35 μM (TR - FRET)。这些 IC_{50} 值与先前文献中公布的结果一致

Ordering information

| Reagent | Amount | Part number |
|---|---------------------|----------------|
| IMAP FP PDE Evaluation Kit | 800 dp* | R8175 |
| IMAP TR-FRET PDE Evaluation Kit | 800 dp | R8176 |
| IMAP FP Screening Express w/Progressive Binding System | 8000 dp | R8127 |
| IMAP TR-FRET Screening Express w/Progressive Binding System | 8000 dp | R8160 |
| cAMP PDE Substrate | 20 nmol 120 nmol | R7505 R7506 |
| cGMP PDE Substrate | 20 nmol 120 nmol | R7507 R7508 |

* Data points

Compatible with these Molecular Devices systems



SpectraMax i3 Multi-Mode
Microplate Reader



SpectraMax Paradigm
Multi-Mode Microplate
Reader



SpectraMax M5 Multi-Mode
Microplate Reader



FlexStation 3 Multi-Mode
Microplate Reader



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
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

Email: info.china@moldev.com
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

