

如何在 SpectraMax iD5 和 i3x 微孔读板机上优化 Transcreener TR-FRET 检测

Joyce Itatani | Applications Scientist | Molecular Devices
Cathy Olsen | Sr. Applications Scientist | Molecular Devices

介绍

Transcreener® HTS 是一种通用的，高通量的生化测定平台，该测定法是基于核苷酸 (ADP) 的检测，核苷酸可由数千种激酶催化形成，其中很多激酶的催化共价调节反应对细胞的信号传导至关重要，并作为靶标在药物发现中具有重要价值。

Transcreener®TR-FRET 测定法是一步竞争性免疫测定法，可直接检测带有远红荧光标记的核苷酸的荧光信号。该测定法是基于时间分辨荧光的共振能量转移 (TR-FRET) 的原理。该测定体系中使用的是与高特异性单克隆抗体 - 淬灭剂偶合物结合的远红示踪剂，在紫外范围 (约 330 nm) 激发铽 (Tb) 配合物会导致其能量转移到示踪剂，并在更高的波长 (665 nm) 产生发射光。目标酶产生的二磷酸或单磷酸核苷酸置换了与抗体链接的示踪剂，导致 TR-FRET 降低 (图 1)。使用红色示踪剂可最大程度地减少荧光化合物和光散射的干扰。Transcreener TR-FRET 测定法是专为 HTS 设计的，采用一步添加，混合和读取的测定模式。

优势

- 一步添加，混合即读取的测定形式，非常适用于高通量筛选
- 使用远红示踪剂和时间分辨荧光技术，将荧光化合物的干扰降至最小
- 使用 10 μM ATP 在 10% 的转化率下达到出色的数据质量 $Z' > 0.7$

验证要求

实现 Transcreener HTS 分析优势的一个关键因素是获取数据的酶标仪的正确设置，是否正确选择仪器设置 (包括滤光片和其他组件) 可能会影响仪器对任何给定测定的灵敏度。通过运行 10 μM ATP/ADP 标准曲线 (24 次重复) 来确定 Transcreener HTS 检测性能的关键仪器参数，并使用该标准曲线模拟酶促反应。从 10 μM 浓度的 ATP 开始，ADP 的量慢慢增加，ATP 的量则按比例地减少，使腺嘌呤核苷酸总浓度保持在 10 μM 。调整闪光次数来实现 $Z' > 0.5$ 的质量要求。如果 ATP 在 10% 的转化率下能达到 Z' 值 > 0.7 ，则表明该仪器能够用于 Transcreener TR-FRET 检测。

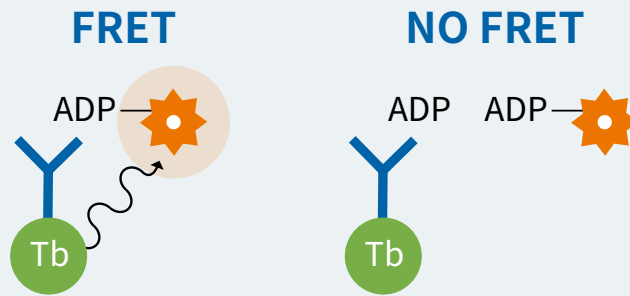


图 1 Transcreener TR-FRET 测定原理。该竞争性测定法使用了供体标记的抗体和作为受体的远红示踪剂。当不存在分析物时，会发生 FRET。在分析物存在下，示踪剂与抗体竞争，FRET 被破坏。

材料

- Transcreener ADP² TR-FRET Red Assay (cat. #3011-1K)
- ATP/ADP 组合液：10 mM MgCl₂, 20 mM HEPES, 0.01% Brij-35 and ATP/ADP (结合成恒定的腺嘌呤浓度 10 μM)
- ADP 检测混合液：1X Stop and Detect Buffer C, 8 nM ADP2 Antibody-Tb Conjugate, 26.8 nM ADP HiLyte 647 Tracer
- High FRET 混合液：8 nM ADP2 Antibody-Tb Conjugate, 26.8 nM ADP HiLyte 647 Tracer, 1X Stop and Detect Buffer C, 10 μM ATP
- Low FRET 混合液：8 nM ADP2 Antibody-Tb Conjugate, 26.8 nM ADP HiLyte 647 Tracer, 1X Stop and Detect Buffer C, 10 μM ADP

标准曲线制备

1. 在 384 孔板的整行中分配 10 μL 的每种 ATP/ADP 组合浓度的组合液。
2. 在这些行中加入 10 μL ADP 检测混合液。
3. 将 10 μL 的 10 μM ATP/0 μM ADP 组合液分配到 P 行。

4. 将 10 μL 的 High FRET 混合液分配到 P1-P12 孔中。

5. 将 10 μL 的 Low FRET 混合液分配到孔 P13-P24 中。

有关制备标准曲线的详细步骤，请参阅相应的 Transcreener 技术手册 (<https://www.bellbrooklabs.com/technical-resources/technical-manuals/>)。

微孔板读板机

- SpectraMax®iD5 多功能酶标仪 (Molecular Devices cat, #ID5-STD)，配备以下组件：
 - TRF 增强模块 (Molecular Devices cat.#0200-7030)
 - 滤光片 320/100 (可由 Molecular Devices 提供)
 - 滤光片 616/10 (Molecular Devices cat. #6590-0118)
 - 滤光片 665/10 (Molecular Devices cat. #6590-012)
- SpectraMax®i3x 多功能酶标仪 (Molecular Devices cat, #I3x)，配备以下组件：
 - HTRF 检测卡盒 (Molecular Devices cat. #0200-7011)

仪器设置

SpectraMax iD5 和 SpectraMax i3x 读板机结合 SoftMax®Pro 数据采集和分析软件，使用优化的设置继续执行以下步骤：

1. 打开 SoftMax Pro 软件，“读数模式”选择 TR-FRET，“读数类型”选择 Endpoint；在 SpectraMax i3x 读板机上，光学配置选择 HTRF (卡盒)。
2. 在 SpectraMax iD5 读板机上，安装 320/100 激发滤光片以及 616/10 和 665/10 发射滤光片，然后从激发和发射下拉波长菜单中选择这些滤光片。在 SpectraMax i3x 读板机上，安装 HTRF 卡盒，当选择 HTRF 作为光学配置时，波长将自动选择。

3. 根据要检测的微孔板选择微孔板的“类型”，待测的微孔板区域选择“读数区域”。
4. PMT 和选项设置：将每次读取闪烁 (或每次读取脉冲) 设置为 20 到 100 (本文应用程序中设置为 50)，测量延迟设置为 0.05 ms，积分时间设置为 0.7 ms。
5. 针对每批新的微孔板或所使用的测定体积，最好优化微孔板位置和读板的高度。

只要体积，微孔板批次，示踪剂和浓度保持不变，相同的仪器设置可用于后续板的读取。表 1 总结了上述设置。

	SpectraMax iD5 reader	SpectraMax i3x reader
Optical configuration	N/A	HTRF (cartridge)
Read mode	TR-FRET	TR-FRET
Read type	Endpoint	Endpoint
Wavelengths	Select 'Use Filter' for both Ex, Em. Excitation: 320 nm Emission 1: 615 nm Emission 2: 665 nm	Excitation: 320 nm Emission 1: 615 nm Emission 2: 665 nm
Plate type	384 Well Corning low vol/rnd btm	384 Well Corning low vol/rnd btm
PMT and optics	Flashes per read: 50 Excitation time: 0.05 ms Measurement delay: 0.05 ms Integration time: 0.7 ms Read height: 5.53 mm from the plate	On-the-fly detection: Off – Stop and Go Number of pulses: 50 Excitation time: 0.05 ms Measurement delay: 0.05 ms Integration time: 0.7 ms Read height: 6.46 mm from the plate
More settings	Show Pre-Read Optimization options	

表 1 SpectraMax iD5 和 i3x 读板机的推荐设置。 使用新批次的微孔板或测定体积的时候，可以对微孔板位置和读板高度进行优化 (使用 SoftMax Pro Software 仪器设置中的“Show Pre-Read Optimization Options”选项)

Flashes (pulses) per read	Z' at 10% ATP conversion	
	SpectraMax iD5 reader	SpectraMax i3x reader
10	0.84	—
20	0.87	—
50	0.87	0.84
100	0.86	0.83

表 2 不同读板机设置下的分析性能。

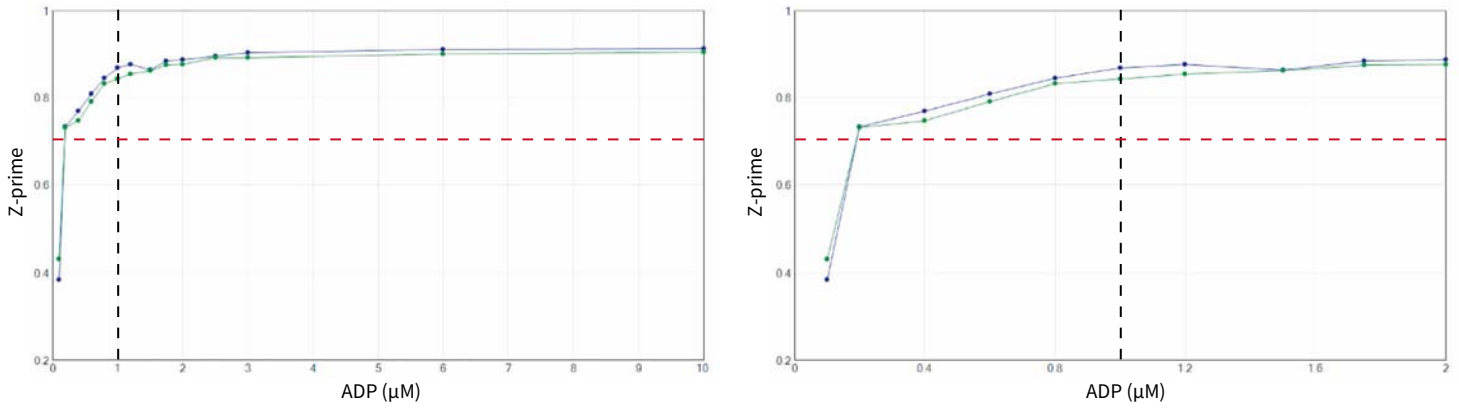


图 2 A) 在模拟 10 μ M ATP 向 ADP 转化的标准曲线中观测到的 Z' 值。B) 标准曲线在 0-2 μ M ADP 区间的放大图, 显示了 Z' 检验的最小合格数据点 (红色虚线) 和 10% ATP 转化的检测点 (黑色虚线)。蓝色图显示了来自 SpectraMax iD5 读板机的数据, 绿色图显示了来自 SpectraMax i3x 读板机的数据, 两者的积分时间均为 50 ms。

结论

在本文中, 我们验证了使用 SpectraMax i3x 和 iD5 多功能读板机进行 Transcreener ADP² TR-FRET 测定过程中表现出的优越性能, 通过使用优化设置, 可以达到 Z' 值 > 0.8 (表 2)。对于这两种仪器, 在 2% 或更高的 ATP 转化率下都达到了高于验证标准 0.7 的 Z' 值 (图 2), 超过了在 10% ATP 转化下 Z' 大于 0.7 的最低验证要求。



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 公署大厦 21 楼

