

用 cAMP-Gs HiRange HTRF 法检测 GPCR 活性

Caroline Cardonnel | Sr. Applications Scientist | Molecular Devices

介绍

HTRF[®] 是由 Cisbio 开发的用于检测生物分子相互作用的通用技术。它将荧光共振能量转移 (FRET) 技术与荧光的时间分辨 (TR) 测量相结合, 可以消除短寿命的背景荧光。该测定使用供体和受体荧光团, 它们用于标记要研究其结合的蛋白质或其他生物分子。当两个生物分子相互结合时, 供体和受体就靠在一起了。能量源 (例如闪光灯) 对供体的激发触发能量转移到受体, 受体继而在给定波长发射特定荧光。

HTRF 使用四种特定的荧光团, 它们可以组合形成相容的供体 - 受体 TR-FRET 对。供体是穴状钕 (Eu^{3+}) 和钷穴状化合物 (Lumi4[™] -Tb), 它们的长寿命荧光使其可用于时间分辨荧光分析。已经开发了两种受体用于 HTRF 分析, XL665 和 d2。两者的激发光谱都与 HTRF 供体的发射光谱重叠, 在 665 nm 处的发射峰落在供体不显著发射的区域内。最初的 HTRF 受体 XL665 是一种从红藻中纯化的藻胆蛋白色素。第二代受体 d2 是改良的别藻蓝蛋白, 比 XL665 小 100 倍, 旨在缓解基于 XL665 的检测可能出现的空间位阻问题。

优势

- 拥有 HTRF 兼容性认证, 确保仪器性能
- 高度稳定、均质的高通量检测
- 使用预设的 SoftMax Pro 软件方法更快地获得结果

HTRF cAMP HiRange 试剂盒可对细胞样品中的环腺苷酸 (cAMP, cyclic adenosine 3', 5' -monophosphate) 进行定量。cAMP 是 G 蛋白偶联受体 (GPCR) 信号传导中的关键第二信使。配体与 GPCR 结合后, 会发生构象变化, 激活受体, 进而激活 G 蛋白。进一步的信号转导取决于激活的 G 蛋白的类型。Gs 蛋白的活化导致腺苷酸环化酶对 cAMP 的上调。细胞产生的游离 cAMP 与 d2 标记的 cAMP 竞争结合抗 cAMP 穴状化合物, 因此细胞 cAMP 的增加导致 FRET 的减少, 这可以通过 665 nm 发射的荧光减少来检测 (图 1)。

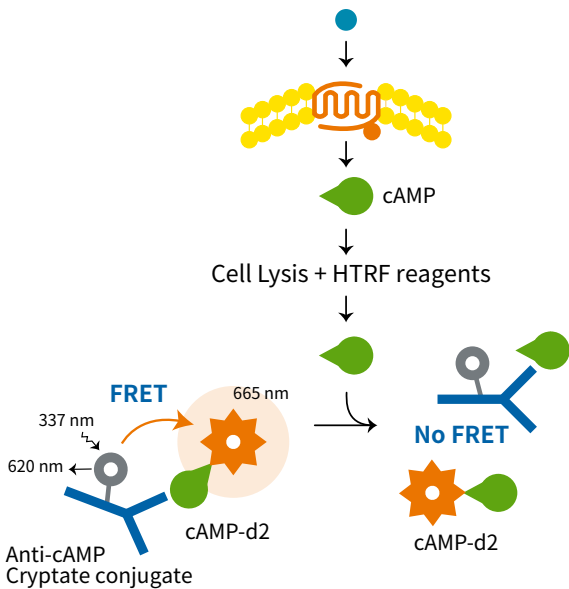


图 1 cAMP 检测原理。细胞产生的未标记 cAMP 与 d2 标记的 cAMP 竞争结合抗 cAMP 穴状化合物偶联物。因此，细胞 cAMP 的增加导致 FRET 的减少。

在这里，我们展示了如何用 SpectraMax® i3x 和 SpectraMax® iD5 多功能微孔板读板机 (均通过 Cisbio 的 HTRF 兼容性认证) 对 GPCR 活性进行稳健、免洗的检测。

材料

- cAMP Gs HiRange 试剂盒 (1000 次测试, Cisbio cat.#62AM6PEB)
- 白色低体积 384 孔微孔板 (Greiner cat. #784075)
- SpectraMax i3x 多功能微孔板读板机 (Molecular Devices cat. #i3x)
- SpectraMax iD5 多功能微孔板读板机 (Molecular Devices cat. #iD5)
- 用于 SpectraMax i3x 多功能微孔板读板机的 HTRF 检测卡盒 (Molecular Devices cat. #0200-7011)
- 用于 SpectraMax iD5 多功能微孔板读板机的 HTRF 检测系统 (Molecular Devices cat. #6590-0144, 包括增强型 TRF 模块和 HTRF 滤片)

方法

cAMP Gs HiRange 试剂盒由 Cisbio 提供。如试剂盒包装插页所示，制备终浓度范围为 0.17 nM 至 2800 nM 的 cAMP 标准品。包括不含 cAMP (最大 FRET) 的阳性对照和不含 cAMP 或 cAMP-d2 的阴性对照。将试剂分配至低体积 384 孔微孔板中，每孔终体积 20 μ L，如表 1 所示。

Negative control	Positive control	Standard curve	Assay control
5 μ L diluent	5 μ L diluent	5 μ L cAMP standard	5 μ L cAMP control
5 μ L diluent			
5 μ L conjugate & lysis buffer	5 μ L cAMP-d2		
5 μ L anti-cAMP-Cryptate			

表 1 384 孔低体积微孔板实验设置。

Parameter	
Optical configuration	HTRF Detection Cartridge
Read mode	TR-FRET
Read type	Endpoint
Wavelengths	Excitation: 340 nm Emission 1: 616 nm Emission 2: 665 nm
PMT and optics	Number of pulses: 30 Excitation time: 0.05 ms Measurement delay: 0.03 ms Integration time: 0.4 ms Read height [optimize]

表 2 SpectraMax i3x 读板机上 HTRF cAMP HiRange 检测的仪器优化设置。

Parameter	
Read mode	TR-FRET
Read type	Endpoint
Wavelengths	Select 'Use Filter' for both Ex, Em. Excitation: 340 nm Emission 1: 616 nm Emission 2: 665 nm
PMT and optics	Number of pulses: 50 Excitation time: 0.05 ms Measurement delay: 0.1 ms Integration time: 0.6 ms Read height [optimize]

表 3 SpectraMax iD5 读板机上 HTRF cAMP HiRange 检测的仪器优化设置。对于 HTRF 读取，必须安装增强型 TRF 模块以及 HTRF 检测系统中包含的激发和发射滤片。

将孔板在室温下加盖孵育一小时。时间分辨荧光在 SpectraMax i3x 和 SpectraMax iD5 微孔板读板机上使用 SoftMax Pro 软件中的预设方法进行测量 (有关仪器特定设置, 请参见表 2 和表 3)。在 SpectraMax i3x 和 SpectraMax iD5 读板机上进行了微孔板优化和读取高度调整, 以确保最佳的检测灵敏度和动态范围。

数据分析

基于检测到的两个发射波长, HTRF 实验使用 Cisbio 专利的比值算法进行分析, 分析步骤如下所示。供体在 616 nm 的发射用作内参, 受体在 665 nm 的发射用作所测定生物反应的指示。这种比率测量减少了孔与孔之间的差异并消除了化合物干扰。Delta F, 在下面的步骤 4 中计算, 反映了检测的信噪比, 可用于内部测定的比较。结果由 665 nm/616 nm 比率计算得出, 并以 Delta F 表示如下:

$$1. \text{Ratio} = \frac{\text{Emission}_{665\text{nm}}}{\text{Emission}_{616\text{nm}}} \times 10^4$$

$$2. \text{Mean ratio} = \frac{\sum \text{ratios}}{n}$$

$$3. \text{CV} = \frac{\text{Std deviation}}{\text{Mean ratio}} \times 100$$

$$4. \text{Delta F} = \frac{\text{Standard or sample Ratio} - \text{Ratio}_{\text{neg}}}{\text{Ratio}_{\text{neg}}} \times 100$$

(Ratio_{neg} = Ratio of negative control)

使用 SoftMax Pro 软件生成和分析数据, 该软件包含多个预设的 HTRF 方法, 其中包含上述步骤以简化检测和分析。

实验结果

数据如上所述进行分析, 并使用 SoftMax Pro 软件使用 4 参数曲线拟合绘制图表 (图 2)。使用表 2 (SpectraMax i3x 读板机) 或表 3 (SpectraMax iD5 读板机) 中指示的读板机设置获得了最佳结果。这些设置是与 Cisbio 合作优化的, 以证明读板机与 HTRF 兼容。更改延迟时间、检测时间或脉冲数可能会导致不太理想的结果。

Cisbio 指出, 使用 EC₅₀ 和信噪比来评估方法的适用性, 二者应分别 ≤ 25 nM 和 ≥ 20。两种读板机的 EC₅₀ 值都非常相似, 并且在可接受的范围内 (表 4)。SpectraMax iD5 读板机的信噪比略有提高, 但两种读板机的信噪比均高于可接受的限值, CV 值低于 6%。SpectraMax i3x 和 SpectraMax iD5 读板机都为 cAMP Gs HiRange 检测提供了高灵敏度和宽的动态范围。

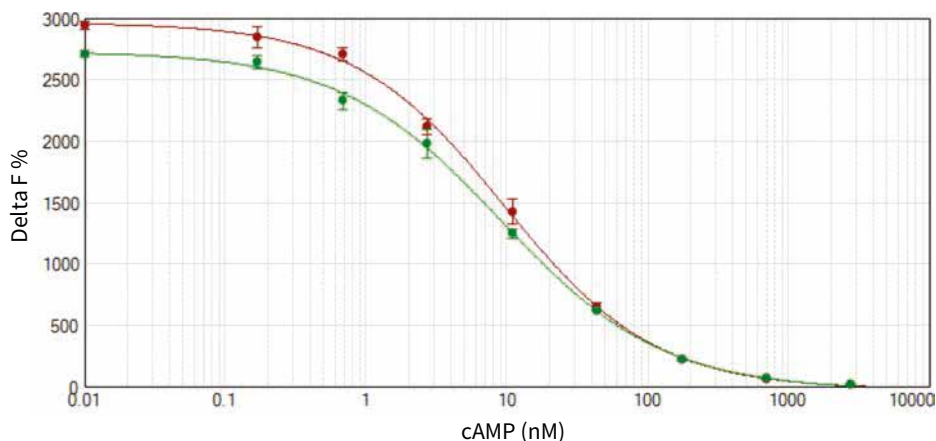


图 2 HTRF cAMP 校准曲线。SpectraMax i3x(绿色圆圈)和 SpectraMax iD5(红色圆圈)读板机上 HTRF cAMP 校准曲线测定。SpectraMax iD5 的检测窗口稍大,但两种读板机的检测质量都非常出色(CV 值 < 6%, $R^2 = 0.999$)。

Parameter	Passing	SpectraMax i3x	SpectraMax iD5
EC ₅₀	≤ 25 nM	9.17	9.66
Signal/noise	≥ 20	28.1	30.5

表 4 cAMP HiRange 标准曲线的结果总结。

结论

SpectraMax i3x 和 SpectraMax iD5 读板机可配备 HTRF 认证的检测卡盒(i3x)或 HTRF 认证的模块和滤片(iD5),以满足 HTRF 检测所要求的苛刻参数。两种读板机都证明了他们进行 cAMP Gs HiRange 检测的能力,结果完全在 Cisbio 要求的范围内。数据采集和分析可以通过使用带有预设 HTRF 方法的 SoftMax Pro 软件来进行简化。

参考文献

1. <http://www.htrf.com/htrf-technology>



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

