

CatchPoint® cAMP荧光检测试剂盒 应用方案解析

介绍

本研究展示了如何在 SpectraMax® i3多功能酶标仪中应用CatchPoint® cAMP荧光检测试剂盒监测腺苷酸环化酶激活剂forskolin对HEK293细胞的影响(如图1)。

G蛋白偶联受体(GPCRs)是重要的跨膜蛋白，能将胞外信号传导入胞内，引起信号逐级放大的级联反应，导致胞内某些蛋白活性或表达的改变[1]。3', 5'-单磷酸化环腺苷(cAMP)作为第二信使参与GPCR活化后的下游反应。当胞外配体作用于GPCR时，GPCR构象发生改变，激活胞内连接的G蛋白。接下来的信号传导路径与被激活的G蛋白类型有关。其中当Gs蛋白被激活时，会导致腺苷酸环化酶活化引起的胞内cAMP浓度上调，进一步激活蛋白激酶A，最终促进一些目标蛋白的磷酸化，这些目标蛋白可能参与了例如多巴胺神经信号传导、葡萄糖再生反应、血管扩张、细胞有丝分裂、卵子成熟等重要生理生化过程[2-6]。

CatchPoint® cAMP荧光检测试剂盒采用免疫竞争原理测得cAMP浓度(如图2)，仅需一步洗脱，且反应底物加入后短可放置10分钟，长可延至24小时后再检测，信号稳定灵敏。

材料

- CatchPoint cAMP荧光检测试剂盒 (Molecular Devices, 货号R8088)
- HEK293细胞 (ATCC 编号CRL-1573)
- KRGB缓冲液 (Sigma, 货号K4002)
- 碳酸氢钠 (Sigma, 货号S5761)
- PBS缓冲液 (Life Technologies, 货号10010)
- 磷酸二酯酶抑制剂, 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤, IBMX (Sigma, 货号17018)
- 30%过氧化氢溶液
- MEM培养基 (Corning, 货号10-010)
- 胎牛血清 (Gemini Bio-Products, 货号100-106)
- 青霉素 (Life Technologies, 货号15070-063)
- Forskolin (Sigma, 货号F6886)
- 多聚-D-赖氨酸包被96孔板 (Corning, 货号354413)
- SpectraMax® i3多功能酶标仪
- SpectraMax® MiniMax™ 300细胞成像系统
- MultiWash+™ 洗板机

优势

- 通过检测cAMP浓度准确衡量GPCR活性
- 只需一步洗脱
- 信号稳定(10分钟-24小时)
- Z 因子为0.91



图1: CatchPoint cAMP检测流程

方法

HEK293细胞培养于全生长培养基(MEM+10%FBS+1%青霉素/链霉素)中,铺满T75培养瓶瓶底80-90%。0.05%胰酶消化后收集细胞,按照25000个/孔的密度接种到96孔板中(多聚-D-赖氨酸包被,黑壁底透),接种密度可在25000-100000个/孔范围,37°C、5%CO₂环境下细胞贴壁培养至少18h。

荧光检测前,先用SpectraMax® MiniMax™ 300细胞成像系统透射光通道观察细胞,以掌握其生长饱和情况,并应用Stain-Free™无标记细胞计数法准确测量细胞数目或覆盖面积百分比(即饱和度),以达到质量控制的目的(如图3)。细胞饱和度高且孔间差异小的行被挑选进行CatchPoint检测。室温下先用0.75mM IBMX预作用细胞10分钟,然后37°C下用系列浓度梯度的forskolin(起始孔浓度1000nM,其他孔按1:3依次稀释)处理细胞15分钟。药物处理后按照CatchPoint检测试剂盒说明书裂解各孔细胞。

接下来按照产品说明书进行操作检测。cAMP标准样品检测得到一条标准曲线,以确认试剂盒功能是否正常,并可通过该拟合方程式计算出细胞样品中cAMP浓度。过程中洗脱步骤使用MultiWash+洗板机。红色底物StopLight加入样品30分钟后用SpectraMax® i3多功能酶标仪读数。SoftMax® Pro软件执行所有数据采集、分析和曲线拟合功能,另外还在模板库中提供了专门的CatchPoint cAMP检测试剂盒预设模板。

结果

在药物刺激前需掌握细胞饱和度情况,该实验中采用了Minimax成像系统以及StainFree无标记技术检测各孔中细胞覆盖面积百分比(如图3)。根据检测结果,A行和C行因为不同孔间均一的细胞生长饱和度被选作待测样品行。各处理孔提取出细胞裂解后的样品进行检测。

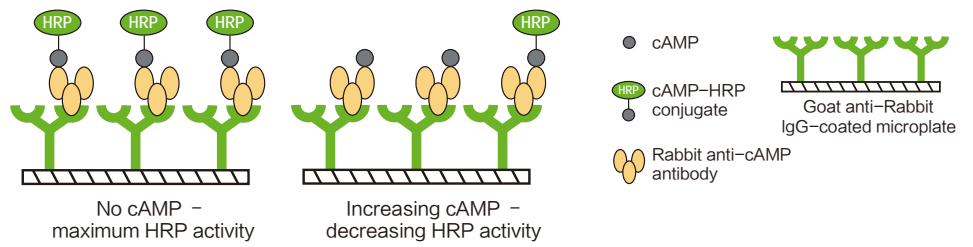


图2: CatchPoint cAMP检测原理 细胞中含有的未标记cAMP与试剂盒中提供的HRP标记cAMP竞争结合上孔板包被的cAMP抗体。通过检测HRP活性降低可反映细胞内cAMP含量增多。

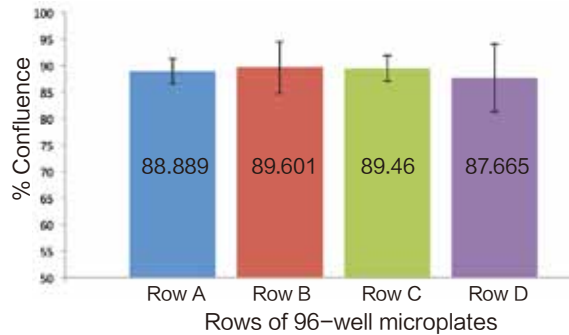


图3: 利用MiniMax细胞成像系统和无标记技术检测HEK293细胞饱和度 A行和C行具有相似的细胞饱和度百分比以及最小的孔间差异,因此被选中进行检测

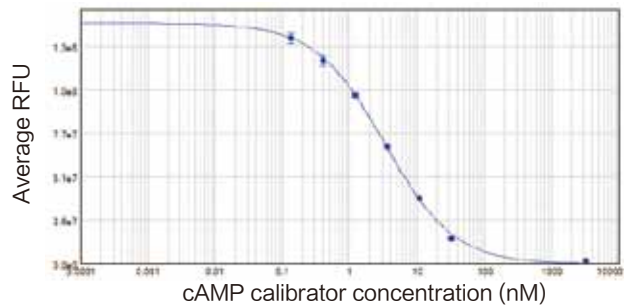


图4: cAMP标准曲线 EC₅₀为3.3 nM,该值与已发表数据一致,样品检测2个复孔

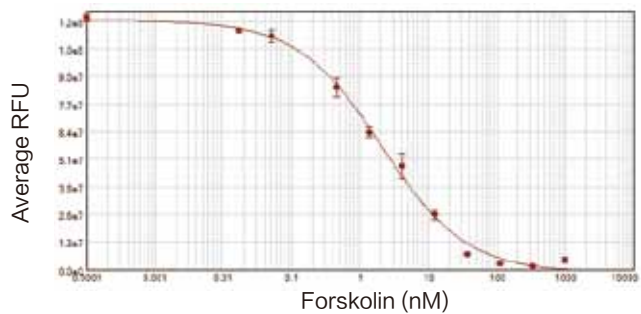


图5: HEK293细胞样品检测结果 得到一条forskolin浓度响应曲线,从起始浓度1000nM开始按1/3稀释的浓度梯度,每种处理样品检测2个复孔,EC₅₀为2.3 nM

图4和5分别显示了cAMP标准曲线和细胞样品药物浓度响应曲线，两条曲线均用4参数拟合。标准曲线得到 $EC_{50} = 3.3$ nM，该值与已发表数据一致[7]，其中Z因子为0.91。Forskolin浓度响应曲线测得 $EC_{50} = 2.3$ nM，该值符合根据HEK293细胞贴壁情况推导的结论。

结论

CatchPoint® cAMP荧光检测试剂盒能通过测量cAMP浓度准确衡量GPCR活性，检测信号极稳定(可维持10分钟-24小时)，优异的Z因子值，应用酶标仪荧光强度功能进行CatchPoint cAMP检测成为高通量药物筛选的可靠选择。

订购信息

试剂名称	描述(反应次数)	货号
CatchPoint cAMP 96-well Explorer Kit	192 次	R8088
CatchPoint cAMP 96-well Bulk Kit	960 次	R8089
CatchPoint cAMP 384-well Explorer Kit	768 次	R8044
CatchPoint cAMP 384-well Bulk Kit	7680 次	R8053

该实验所使用的Molecular Devices酶标仪：



带MiniMax™ 300细胞成像系统的SpectraMax® i3多功能酶标仪



MultiWash+™ 洗板机

参考文献

1. Zaccolo, Manuela. "cAMP signal transduction in the heart: understanding spatial control for the development of novel therapeutic strategies." *British Journal of Pharmacology* 158.1 (2009): 50-60.
2. Hanoune, Jacques, and Nicole Defer. "Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 41.1 (2001): 145-174.
3. Griending, Kathy K., et al. "Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 20.10 (2000): 2175-2183.
4. Kemp, Bruce E., et al. "Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase." *Trends in Biochemical Sciences* 24.1 (1999): 22-25.
5. Etgen, Anne M., Michael A. Ansonoff, and Arnulfo Quesada. "Mechanisms of ovarian steroid regulation of norepinephrine receptor-mediated signal transduction in the hypothalamus: implications for female reproductive physiology." *Hormones and Behavior* 40.2 (2001): 169-177.
6. Chini, Eduardo N., et al. "Adrenomedullin suppresses mitogenesis in rat mesangial cells via cAMP pathway." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 215.3 (1995): 868-873.
7. Hesley, Jayne, Janet Daijo, and Anne T. Ferguson. "Stable, sensitive, fluorescence-based method for detecting cAMP." *BioTechniques* 33.3 (2002): 692-694.



扫一扫关注我们
的官方微信