

APPLICATION NOTE

# 使用 FLIPR 钾离子检测试剂盒进行基于细胞的氯化钾转运体实验方法开发

#### 介绍

氯化钾转运体成员 5 (SLC 12 A 5 或 KCC 2) 是由 SLC 12 基因家族编码的九种阳离子氯离子共转运体 (CCCs) 之一,是神经元中唯一优先表达的 CCC 转运体。 KCC 2 在中枢神经系统的正常运作中起着至关重要的作用,在维持神经元细胞内 Cl-浓度 ([Cl-]。) 方面起着关键作用。 KCC 2 参与了许多神经元过程的控制,其受损的活动已在脊髓损伤后的癫痫、神经性疼痛和痉挛中得到证实。 这表明 KCC 2 活性或表达的阳性调节剂可能为 KCC 2 功能缺陷引起的神经系统疾病提供有效的治疗。

FLIPR 钾离子检测试剂盒含有一种新型的高灵敏度铊 (Tl<sup>+</sup>) 指示剂染料,该染料通过钾离子通道与 Tl<sup>+</sup> 结合后产生明亮的荧光。信号强度与细胞上钾离子通道开放数量成正比;因此它可以作为钾离子通道活性的替代指标。该试剂盒还采用了 Molecular Devices 专有的屏蔽染料,以减少背景荧光,从而提高信号/背景比。由于 Tl<sup>+</sup> 也由阳离子-氯离子共转运体转运,因此 FLIPR 钾检测试剂盒可以通过测量 KCC 2 介导的 Tl<sup>+</sup> 转运/流入的初始速率,轻松评估化合物对 KCC 2 活性的影响。

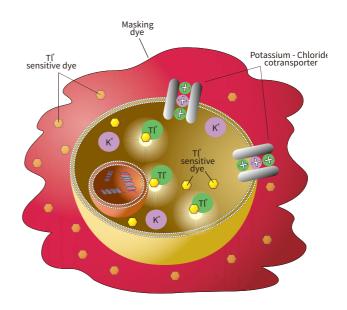
# 实验原理

与非均质检测相比,该检测试剂盒的 TI<sup>+</sup> 指示剂染料具有一个扩大的信号窗口。BTC - am 是一种 Ca<sup>2+</sup> 指示剂,由于 TI<sup>+</sup> 离子也能增强 BTC 的荧光,因此也被用于钾离子通道的监测。在染料加载过程中,TI<sup>+</sup> 指示剂染料以乙酰氧基甲基酯 (AM) 的形式通过细胞膜被动扩散进入细胞。细胞质酯酶裂解AM 酯,释放出活性的成氟形式。检测试剂盒中含有一种专有的细胞外屏蔽染料,以减少背景荧光 (图1)。为了激活氯化钾转

运体,在存在或不存在测试化合物 (如 KCC 2 抑制剂 ) 的情况下,用 K+和 Tl+的混合物 刺激细胞。在使用的检测条件下,荧光信号的增加代表了 Tl+通过共转运体特异性地进入细胞,因此代表了对共转运体活性的功能测量。共转运体活性的调节是通过包含 KCC2 抑制剂来实现的。FLIPR 钾离子检测试剂盒 (Molecular Devices,Cat# R8222)含有 Tl+敏感染料,用于均相操作的屏蔽染料,200 mm K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,50 mm Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,5X 无氯缓冲液,以及含有 20 mm HEPES 的 HBSS缓冲液。该试剂盒可用于10个96、384-或1536 孔板。检测工作流程如图 2 所示。

# 优势

- 基于细胞的实验中 K+/ cl 共转 运体活性的动态检测提供了丰 富的信息数据
- 均质免洗方案减少了孔与孔之 间的变化,提高了检测的一致 性和有效性
- 非放射性试剂 (不像传统的 Rb<sup>+</sup> 射流检测)
- 适用于高通量筛选



**图1 FLIPR 钾离子检测试剂盒原理。** 细胞胞质 TI<sup>+</sup>的增加可通过 FLIPR 或 FlexStation 系统使用铊敏感染料指示剂检测到。

# 实验流程

#### 细胞培养和转染

HEK 293T (ECACC Cat. # 12022001) 细胞在含有生长培养基(补充有 10% FBS 和 2 mm L - 谷氨酰胺的 DMEM)的 T75 烧瓶中生长至 80 - 90% 汇合。在 5% CO<sub>2</sub>的存在下,培养物保持在 37°C。细胞每 3 - 4 天传代一次,传代率为 1:6。实验前两天用Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Cat. # 11668027)转染人 KCC 2 (hKCC 2) 细胞。根据制造商的说明。转染混合物与生长培养基混合,直接在 10000 个细胞/孔的 96孔黑壁透明底板上铺板培养,37°C、5% CO<sub>2</sub>,孵育 48 小时。

#### KCC 2 抑制实验

孔板中的生长培养基被移除,然后添加 FLIPR 钾离子检测试剂盒或 BTCAM (2 μM) 在 37°C 条件下避光孵育一小时。加载的缓 冲液中包含 10 μM 布美他尼,用于减少内 源性 NKCC Tl+ 流入/传输信号,同时含有 0.1 mM 乌本苷,作为一种 Na+/K+ - ATP 酶 阻断剂,用于抑制 ATP 依赖的细胞膜钠钾 交换。在加载染料之后,清洗 BTC - AM 共 孵育的细胞以去除多余的染料。添加 KCC 2 抑制剂,并在染料加载时间的最后 45 分钟孵育(FLIPR 钾离子检测试剂盒处 理组)。在 FLIPRTETRA 系统上检测时, 在孔中加入优化的刺激缓冲液 (9 mm K+/0.9 mM Tl<sup>+</sup>)。Tetra 系统采用 470 - 495 nm 激 发 LED 和 515 - 575 nm 发射滤光片。数据 文件被导入 SoftMaxPro 数据采集和分析 软件中,以便使用导入特性(图3)进行后 续分析,该特性可用于 SoftMaxPro 6.4.1 或更高版本。初始速率(Vmax,单位为每 秒)是根据刺激后的前10秒数据计算出来 的。

Add 50 µL of Start with **Incubate for** Remove K+/TI+ 10,000 60 min. at growth stimulus cells/well in a 37°C in the media and buffer & black walled dark, add 22 replace with measure clear bottom μ**L of 10X** 200 μL/well fluorescent 96-well compound dye solution signal for 5 microplate after 15 min. min.

图 2 FLIPR 钾离子检测试剂盒在 FLIPRTetra 高通量实时荧光检测分析系统上的工作流程。

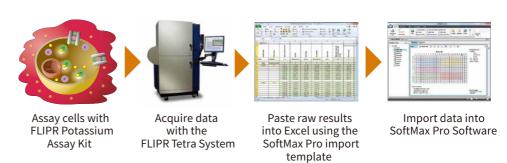


图 3 SoftMax Pro 6.4.2 导入流程。

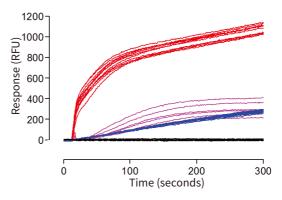


图 4 FLIPR Tetra 系统上获取的代表性荧光信号轨迹 (每个处理组 ≥ 6 孔), HEK 293 细胞加载了 FLIPR 钾离子检测试剂盒或 BTC - AM。数据显示,在 hK CC 2 转染细胞中,仅添加缓冲液 (-) 或添加 Tl¹ (-),以及在加载 FLIPR 钾离子检测试剂盒的模拟转染细胞中,仅添加缓冲液 (-) 或添加 Tl¹ (-) 的效果。同时,还比较了添加 Tl¹ (-) 对转染细胞中加载 BTC - AM 的影响。

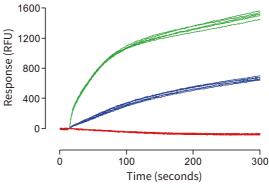


图 5 FLIPR Tetra 系统上获取的代表性荧光信号轨迹,hK CC2 - 转染细胞加载了 FLIPR 钾离子检测试剂盒。数据显示了在 30  $\mu$ M R - (+) - DIOA 存在或不存在情况下,只添加缓冲液 (-) 或添加 Tl<sup>+</sup> 的效应。

### 结果

用新型 FLIPR 钾离子试剂盒或 BTC - AM 加 载 hKCC 2 转染或模拟转染的 HEK 293 细胞 后,我们测量了在 FLIPR Tetra 系统上检 测时添加外部 Tl+引起的荧光增加。在装有 FLIPR 钾离子检测试剂盒的细胞中加入 Tl+ 后,hKCC 2 驱动的 FLIPR 信号在最初 10 秒内呈现快速增长, 随后增长较慢, 最终 进入平稳期。与模拟转染细胞相比, hKCC 2 转染细胞荧光信号显著更高 (P < 0.001; Student's t-test),如图 4 所 示。平均 Z 因子计算为 0.60 ± 0.05,表明 实验结果的稳定和可靠 2。与此相反,BTC-AM 加载细胞的信号增加较慢,表现出很大 的变异性,信号的大小要低得多。由于这 些原因,没有进一步比较分析试剂盒和 BTC - AM<sub>o</sub>

然后我们用加载有 FLIPR 钾离子试剂盒的 表达 hKCC 2 的细胞进行了一系列实验,以 评估 Tl+内流试验是否可以用于检测 hKCC 2活性的调节剂。在每一个96孔板中,细 胞被分为对照溶液组或 30 μM R - (+) - DIOA (一种烷酸,已被证明是 K+/Cl-协同转运 体的一种有效的选择性抑制剂)组。从图 5中可以看出,K+/Tl+-诱发的荧光增强所 产生的信号在孔与孔之间非常一致,对照 组信号与 R - (+) - DIOA 信号显著区分 (P < 0.001; Student's t - test).

在没有抑制剂的条件下, K+/Tl+刺激产生 Vmax 53.9  $\pm$  5.1 (units/second),而在30 μM R - (+) - DIOA 条件下,超过四次独立实 验中总计n≥30孔的结果表明(Figure 6), Vmax 减少至 17.5 ± 1.9 (units/second)。

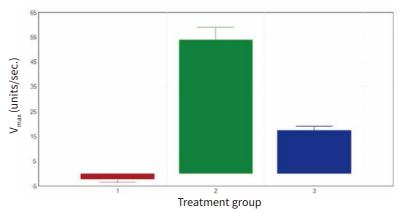


图 6 不同条件对 hkcc 2 转染细胞的影响。数据显示了三种不同处理组的结果:1.只添加缓冲溶液 (n), 和 2. 在没有 (n) 或 3. 存在 (n) 30 μM R - (+) -DIOA 的情况下添加 Tl+/K+。柱状图代表的意思是Vmax (units/sec.)  $\pm$  SEM (n  $\geq$ 30).

#### 结论

我们已经证明 FLIPR 钾离子检测试剂盒可 以使用均匀的、不清洗的方案来测量 hKCC 2 阳离子 - 氯离子共转运体的功能活 性。该检测试剂盒显示出较大的检测窗 口和良好的重现性,能够成功地检测到 已知的 hKCC 2 活性调节剂。与传统染料如 BTC - AM 相比,简化的实验方案和稳健的 检测质量,结合 FLIPR Tetra 系统的高通 量能力,为筛选 hKCC 2 共转运体调节剂提 供了一个强大的解决方案。

#### 致谢

Andrea Townsend-Nicholson and Stephanie Schorge, University College London, and Simon Lydford, Molecular Devices (UK) Ltd.

# 参考文献

1. Kahle KT, Staley KJ, Nahed BV, Gamba G, Hebert SC, Lifton RP, et al. Roles of the cation - chloride cotransporters in neurological disease. Nat Clin Pract Neurol. 2008;4:490-503.



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 www.MolecularDevices.com.cn Email: info.china@moldev.com

上海 电话: 86-21-3372 1088 北京 电话: 86-10-6410 8669

成都 申话: 86-28-6558 8820 台北

电话: 886-2-2656 7585

传真: 86-21-3372 1066 传真: 86-10-6410 8601 传直: 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:香港中环皇后大道中15号置地广场 公爵大厦21楼

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

MOLECULAR DEVICES