

## APPLICATION NOTE

# 在 FlexStation 3 读板机上使用 FLIPR Calcium 6 和 6-QF 检测试剂盒进行钙信号通路测定

## 简介

来自 Molecular Devices 公司的 FLIPR® Calcium 检测试剂盒使用敏感的钙指示剂和专有的掩蔽染料,使研究人员能够对 G 蛋白偶联受体 (GPCRs)、离子通道和其他钙敏感靶点进行高度敏感的荧光筛选。通过使用一种新的染料配方来进一步增强钙流检测信号窗口,提高了测定的稳定性,同时提供了更高的测定方案灵活性。因此,FLIPR Calcium 6 和 Calcium 6-QF 钙试剂盒染料更适合于使用 16 通道移液头以中等通量的 FlexStation® 3 多功能微孔板读板机测量 384 孔板中的钙流。结果与 FLIPR® Tetra 系统在高通量模式下获得的结果相似。

## 检测原理

如图 1 所示, FLIPR Calcium 6 检测染料进入细胞的胞质中。掩蔽技术不进入细胞,但显著减少了来自残留细胞外的钙指示剂、培养基和其他成分的背景荧光。FLIPR Calcium 6-QF 检测试剂盒配方不含掩蔽技术,为淬灭敏感的靶标或多色应用提供了一种新的、灵活的选择。提供了额外的检测灵活性,在检测中使用丙磺舒的要求最小到没有要求。某些细胞,如中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系中有一种阴离子交换蛋白,需要使用阴离子再摄取抑制剂,如丙磺舒,才能在胞质中保留常用的钙指示剂。独特的 FLIPR Calcium 6 检测试剂盒染料配方对此类有机阴离子转运体具有更强的抗性,因此可能需要较少或不需要丙磺舒。

## 材料和方法

使用新的 FLIPR Calcium 6 和 Calcium 6-QF 检测试剂盒开发了检测 HeLa 细胞中表达的内源性组胺受体的方法,然后与其他商业上可用的试剂盒进行比较。采用 'Flex' 读数模式在 FlexStation 3 读板机上测定钙流。将保存在连续培养中的 HeLa 细胞以 5000 个细胞 / 孔接种在含有 50  $\mu$ L 生长培养基的黑壁、底透的 384 孔微孔板中,然后在 37°C、95% 湿度和 5% CO<sub>2</sub> 下过夜。第二天,细胞培养板按照制造商的建议 (包括水溶性丙磺舒) 加入适当的钙试剂盒试剂,并根据制造商的方案孵育 60 或 120 分钟。

## 优势

- 相比其他的钙试剂和染料提供了最大的信号窗口
- 可对包括内源性、原代或干细胞靶标进行弱信号筛选
- 专利的一步法方案所使用的掩蔽技术大大减少了细胞外背景
- 对有机离子转运体的抗性可使对阴离子再摄取抑制剂的需求最小化

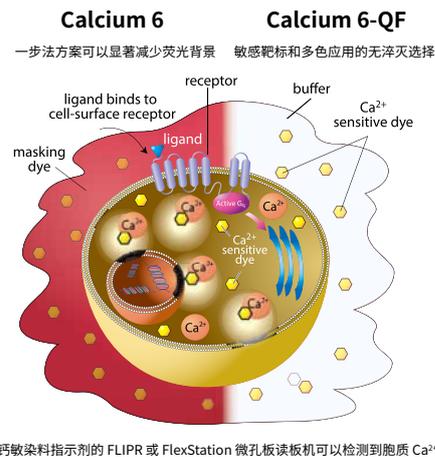


图 1 具有或不具有掩蔽技术的检测灵活性。

使用 FlexStation 3 读板机集成的 16 通道移液器, 用不同浓度的组胺 (从 100  $\mu\text{M}$  开始, 3 倍稀释) 对细胞提出挑战。使用优化的参数在化合物添加前中后进行 60 秒的荧光测定 (表 1)。在拮抗剂研究中, 使用 FlexStation 3 读板机的机载移液系统加入咪唑和利培酮 (从 30  $\mu\text{M}$  开始, 3 倍稀释), 并允许平衡 30 分钟。然后用 15  $\mu\text{L}$ /孔的组胺 ( $\text{EC}_{80}$  浓度) 刺激细胞, 同时实时监测荧光强度的变化。

比较所用的钙指标是:

- FLIPR Calcium 6 检测试剂盒 (Molecular Devices)
- FLIPR Calcium 6-QF 检测试剂盒 (Molecular Devices)
- Fluo-4 Direct Calcium 检测试剂盒 (Life Technologies)

### FlexStation 3 读板机设置

细胞板在 FlexStation 3 读板机中维持 37°C。将化合物准备在 Greiner 384 孔聚苯乙烯深孔板中, 用 FlexStation 3 移液头 (黑色) 进行化合物转移。具体参数见表 1。

### 结果和分析

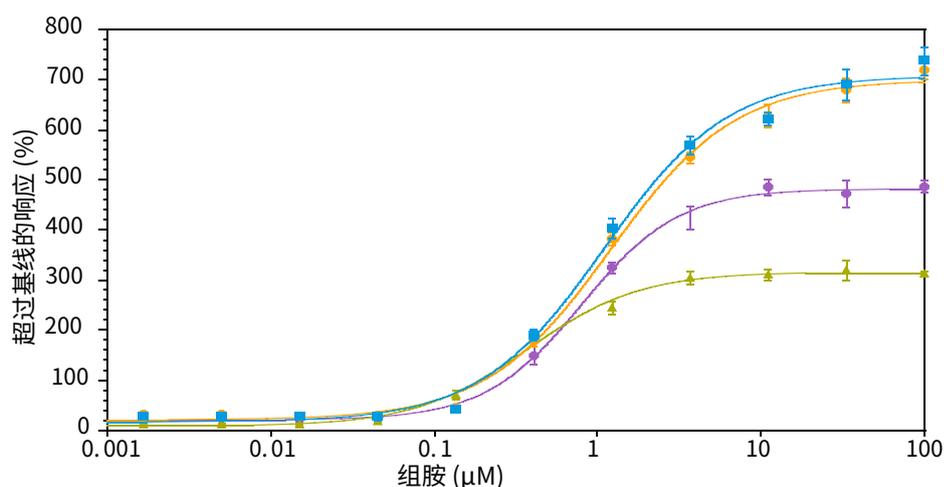
以峰值荧光强度测定响应。为了便于比较, 将数据归一化为基线上的 % 响应, 并表示为  $n = 4$  的平均  $\pm$  标准差。使用 SoftMax<sup>®</sup> Pro 软件将各组浓度响应数据拟合到四参数曲线上 (图 2-5)。

参数	设置
Read type	Flex
Read mode	Fluorescence, bottom read
Ex wavelength	485 nm
Em wavelength	525 nm
Cut-off	515 nm
Run time	60 sec
Interval	2.2 sec
PMT level	Medium

化合物添加	
Initial volume	50 $\mu\text{L}$
Pipette height	40 $\mu\text{L}$
Volume	1st addition: 12.5 $\mu\text{L}$ antagonist
	2nd addition: 15 $\mu\text{L}$ agonist
Rate	3 (12 $\mu\text{L/s}$ )
Addition time point	19 sec.

**表 1 FlexStation 读板机设置。** 结合 Opti-MEM 培养基、DNA 和转染试剂在本体系反应中形成转染复合物。制备足够的复合物, 为每个实验条件转染 10 个孔。



4-P Fit:  $y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$

	A	B	C	D	R <sup>2</sup>
Ca5 (Ca5_Hist_An tago: Concentration vs MeanV alue)	18.8	1.46	0.801	481	0.999
Fluo4Direct (F4D_Hist_An tago: Concentration vs MeanV alue)	6.44	1.26	0.374	315	0.997
Ca6 (Ca6_Hist_An tago: Concentration vs MeanV alue)	19.3	1.14	12	699	0.997
Ca6QF (Ca6QF_Hist_An tago: Concentration vs MeanV alue)	15	1.14	1.09	707	0.995

Weighting: Fixed

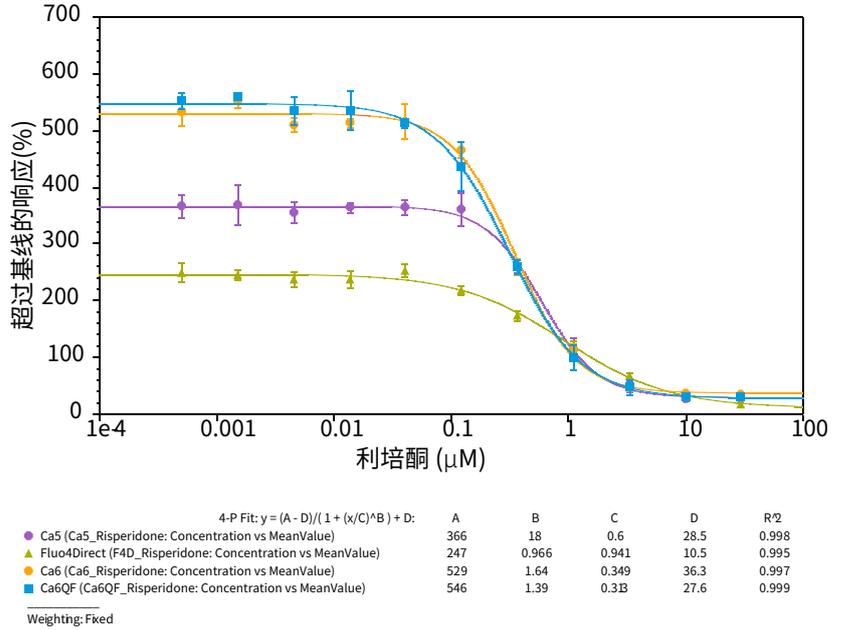
组胺	Calcium 6	Calcium 6-QF	Calcium 5	Fluo-4 Direct
$\text{EC}_{50}$ $\mu\text{M}$	1.2	1.1	0.8	0.37
Z@ $\text{EC}_{80}$	0.87	0.92	0.87	0.82

**图 2 FLIPR Calcium 6 和 6-QF 检测试剂盒提供最大的信号窗口。** 组胺 H1 是 HeLa 细胞的内源性受体。将 FLIPR Calcium 6 和 6-QF 与其他染料进行比较, 发现两者都有最大的信号窗口。 $\text{EC}_{80}$  值在一半对数和 Z 因子在  $\text{EC}_{80}$  处具有可比性。

## 总结

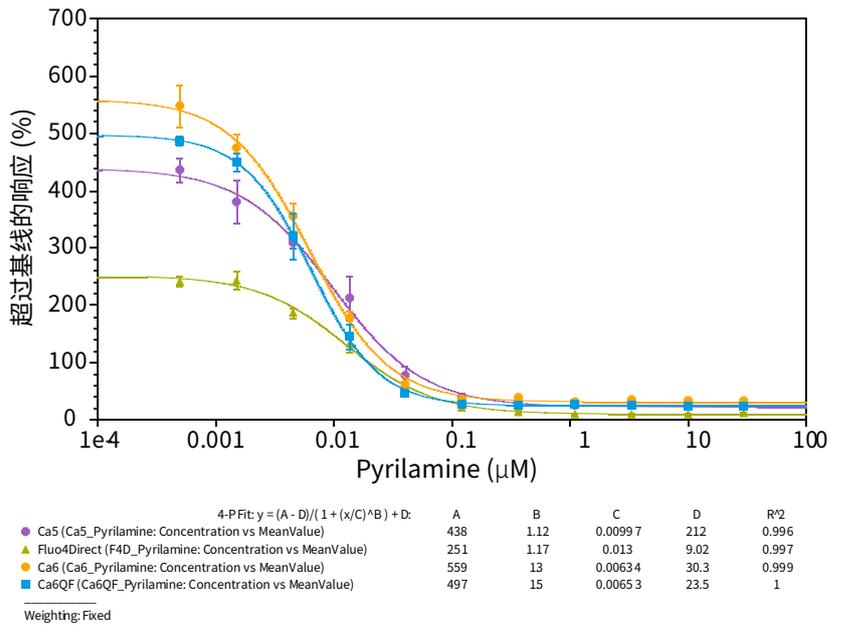
FLIPR Calcium 6 和 Calcium 6-QF 检测试剂盒提供灵活的钙流检测，包括中等通量选项，如 FlexStation 3 读板机，同时提供可靠的药理学、优越的信号窗口和高质量的检测性能。获得更大的信号窗口是很重要的，因为现在的许多实验都面临着挑战，已见不到标准的激动剂或拮抗剂使用过表达的受体进行实验了。使用内源性受体、受体低表达、冷冻细胞、原代细胞或干细胞的细胞系可能产生较低的信号窗口。此外，更大的信号窗口在进行实验以识别变构调节剂方面是一个优势。

不会淬灭的 FLIPR Calcium 6-QF 检测试剂盒选项为研究淬灭敏感靶点提供了新的检测灵活性。最后，在没有阴离子再摄取抑制剂的情况下，研究诸如 CHO 细胞系中靶行为的能力是有益的，因为某些受体和离子通道可能是丙磺舒敏感的，其使用可能会改变自然的生物学机制。由 FLIPR Calcium 6 试剂盒提供的更大的信号窗口使其成为一个强有力的检测方法，用于利用这些具有挑战性的靶标和细胞系进行化合物筛选和优化。



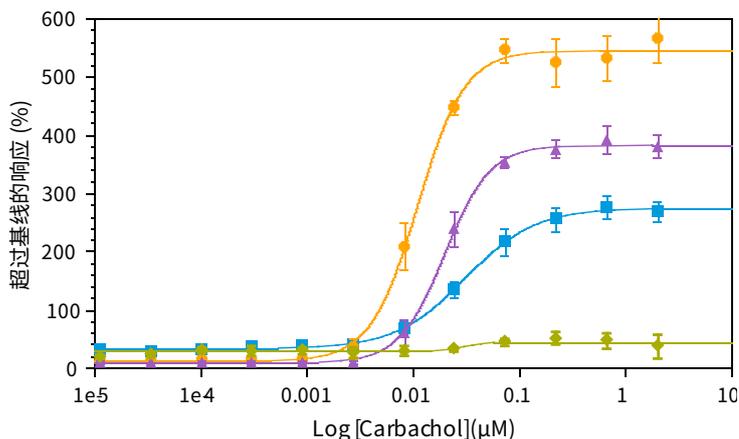
噻吨胺	Calcium 6	Calcium 6-QF	Calcium 5	Fluo-4 Direct
IC <sub>50</sub> μM	0.35	0.31	0.6	0.94
Z@ IC <sub>50</sub>	0.77	0.83	0.81	0.67

**图 3 利培酮拮抗剂对 HeLa 细胞组胺作用的响应。**利培酮是一种治疗精神分裂症的抗精神病药物。它是一种多巴胺拮抗剂，也具有抗组胺作用。Calcium 6 和 6-QF 染料的信号为拮抗剂测定提供了最大的窗口。在 IC<sub>50</sub> 浓度下，IC<sub>50</sub> 值在一半对数和 Calcium 6-QF 的 Z' 因子最高。



噻吨胺	Calcium 6	Calcium 6-QF	Calcium 5	Fluo-4 Direct
EC <sub>50</sub> μM	0.006	0.007	0.01	0.013
Z@ IC <sub>50</sub>	0.76	0.58	0.36	0.6

**图 4 噻吨胺拮抗剂对 HeLa 细胞组胺作用的响应。**噻吨胺是第一代组胺 H1 拮抗剂。由于 FLIPR Calcium 6 检测试剂盒提供的信号窗口较大，IC<sub>50</sub> 处的 Z' 因子最大。此外，Calcium 6-QF 试剂盒还提供了一种可靠的检测方法，在研究淬灭敏感靶标时不需要洗涤。



	A	B	C	D	R <sup>2</sup>
Ca6 - PBX (Ca6 - PBX: Conc vs MeanValue)	32.7	1.31	0.031	274	0.999
Ca6 + PBX (Ca6 + PBX: Conc vs MeanValue)	11	1.96	0.011	545	0.998
F4D + PBX (F4D + PBX: Conc vs MeanValue)	8.18	2.03	0.0199	382	0.999
F4D - PBX (F4D - PBX: Conc vs MeanValue)	27.4	3.35	0.0312	45.7	0.823

Weighting: Fixed

碳酰胆碱	Calcium 6	6 without 不含丙磺舒	Fluo -4 Direct	Fluo-4 Direct 不含丙磺舒
EC <sub>50</sub> μM	0.031	0.011	0.031	0.02
Z@ EC <sub>80</sub>	0.92	0.52	0.57	-1.31

**图 5 FLIPR Calcium 6 检测染料不需要使用阴离子再摄取抑制剂。**用 CHO-M1 细胞和 Calcium 6 染料进行的测定显示了对碳酰胆碱的响应，而不需要与丙磺舒孵育。相对应的 Fluo-4 Direct 检测几乎没有信号。Calcium 6 染料是了解可能对阴离子再摄取抑制剂敏感的靶点的重要新进展。



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 公爵大厦 21 楼

