



## FLIPR<sup>TETRA</sup> 系统检测 G<sub>i</sub>-和 G<sub>s</sub> 偶联 GPCR 介导的第二信使 cAMP 信号变化

### 简介

在这篇应用文献中我们展示了基于 Promega 公司 GloSensor™ cAMP 实验中的修改后的发光萤火虫荧光素酶的应用。在 FLIPR<sup>Tetra</sup> 高通量筛选系统进行 cAMP 水平的检测以保证在动力学模式下精确检测 G<sub>i</sub> 和 G<sub>s</sub> 偶联的 GPCR 活性。通过这样的实验,基于对细胞内相关第二信使 cAMP 浓度变化的检测可以对 GPCR 亚型进行评价。G<sub>i</sub> 和 G<sub>s</sub> 偶联 GPCR 的第二信使信号活性的检测传统方法一般采用放射性结合或需要细胞裂解的终点法 cAMP 实验方法。这些类型的实验都是检测一个单独时间点下的细胞反应和活性,不能提供动力学信息。另一种选择时采用强制耦合到 G<sub>α16</sub> 的 G<sub>s</sub>-和 G<sub>i</sub>-GPCRs,检测受体激活后钙离子流引发的荧光信号检测。然而,这种方法由于不是直接的反应 cAMP 通路生物相关性信号变化,只能作为第二位选择。我们展示了稳定表达 Glosensor 质粒的 CHO-K1 和 HEK-293 细胞系中的内源性受体活性。另外,在瞬时转染了 Glosensor 质粒的细胞系中检测了稳定转染的 G<sub>s</sub>-和 G<sub>i</sub>-偶联受体活性。结合 Glosensor cAMP 方法,FLIPR<sup>Tetra</sup> 系统建立了一个灵活的完整解决方案用于 GPCR 主要亚型的动力学筛选。

如图 1 所示, Glosensor cAMP 检测实验主要通过 cAMP 结合域融合到野生型的萤火虫荧光素酶的 N-和 C-末端来实现。cAMP 缺乏时,基因修饰过的含有 cAMP 结合域的荧光素酶处于未激活状态。一旦结合了 cAMP 后, cAMP 结合域构象发生变化处于激活状态引起化学发光信号增加,从而被 FLIPR<sup>Tetra</sup> 系统检测到。更多关于 Glosensor cAMP 实验的信息可参考技术手册 (Cat# TM076, Promega)。

结合质粒瞬时转染或稳定转染的灵活的 G<sub>s</sub>-和 G<sub>i</sub>-偶联的 GPCR 实验设计是可行的。四种可供选择的来自 Promega 的细胞系或靶标细胞系见下:

灵活的 GloSensor cAMP 实验设计

- Stable receptor and stable GloSensor cAMP assay
- Transient receptor and stable GloSensor cAMP assay
- Stable receptor and transient GloSensor cAMP assay
- Transient receptor and transient GloSensor cAMP assay

The intracellular biosensor of the GloSensor cAMP Assay (Figure 1)

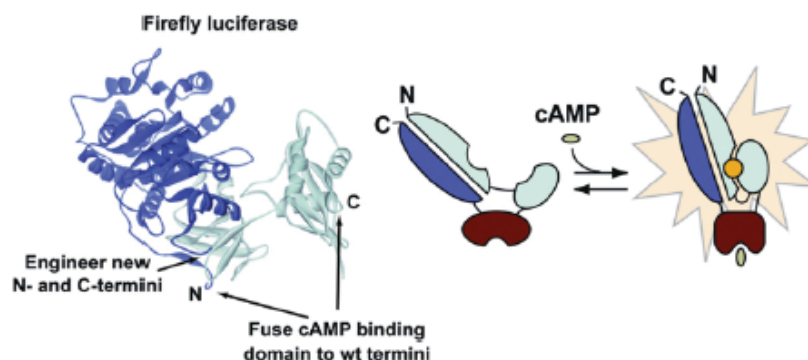


Figure courtesy of Promega Corporation.

## FLIPR Tetra 系统:

- 超灵敏 ICCD 相机既可以对化学发光检测，同时也可以检测荧光信号
- 活细胞中动态的 cAMP 冷光信号检测通过 FLIPR<sup>Tetra</sup> 系统的超灵敏 ICCD 相机来实现
- 实验通量: 96-, 384-和 1536-孔记录板规格，可很方便与自动化设备整合

## 材料

### cAMP 细胞系和质粒

- GloSensor cAMP HEK 293 stable cell line (Promega Corporation, Cat. #E1261)
- GloSensor cAMP 23F CHO K1-stable cell line (Promega R&D)
- Rat Y2R/GloSensor cAMP 23F CHO-K1 double stable cell line (Promega R&D)
- GloSensor cAMP assay plasmid pGlosensor-22FcAMP (Promega, Cat. #E2301)
- Dopamine D4 stable HEK 293T cell line (Multispan Inc., Cat. #C1338)

### 细胞培养试剂

- HEK 293 cell growth medium: 90% DMEM (Life Technologies, Cat. #11995-065), 10% FBS (Hyclone, Cat. #SH.30071), 200 µg/mL hygromycin B (Sigma, Cat. #H3274)
- GloSensor cAMP-23F CHO-K1 cell growth medium: 90% F-12 Medium (Life Technologies, Cat. #11765), 10% FBS, and 200 mg/mL hygromycin B)
- Glo Sensor cAMP-23F/Y2R CHO-K1 double stable cell growth medium: 90% F-12 Medium (Life Technologies, Cat. #11765), 10% FBS, and 200 µg/mL hy- gromycin B), and 500 µg/mL G418 (Life Technologies, Cat. #10131027)

## 实验试剂

- Plating medium: 90% CO<sub>2</sub>-independent medium (Life Technologies, Cat. #18045), 10% FBS
- HEPES buffer: Re-suspend HEPES in deionized water to 10 mM; adjust pH to 7.5 using KOH
- GloSensor cAMP Reagent stock solution: Re-suspend 250 mg GloSensor cAMP Reagent (Promega, Cat. #E1291) in 8.17 mL of HEPES buffer; store at -70°C in single-use aliquots
- 平衡溶液: 种植液 (见上) 和 2%或 5% GloSensor cAMP 试剂; 需根据具体实验情况进行优化
- 化合物: (-)异丙肾上腺素(Sigma, Cat. #I6504); 羟甲叔丁肾上腺素(Sigma, Cat. #S8260); 普萘洛尔(Sigma, Cat. #P0884); 吲哚洛尔(Sigma, Cat. #P0778); 阿普洛尔(Sigma, Cat. #A8676); 多巴胺(Sigma, Cat. # H8502). Peptide YY(3-36), (Tocris Cat. #1618); 所有化合物母液均配置为 10 mM , 添加 HBSS + 20 mM HEPES 做进一步的稀释

## 方法

### 稳定的 GloSensor cAMP 细胞系实验方法

Step 1. 细胞在 384 孔黑壁底透的细胞板 (Corning, Cat. #3712) 中过夜培养。

Step 2. 实验前 2 小时, 去除培养基并在 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养细胞 1 小时, 然后每孔加入含 Glosensor cAMP 试剂的平衡溶液 30 µL 室温下在放置 1 小时。

- HEK 细胞孵育在含 2% Glosensor cAMP 试剂的平衡溶液中
- CHO-K1 细胞孵育在 5% Glosensor cAMP 试剂中

Step 3. 动力学检测过程中通过 FLIPR<sup>Tetra</sup> 系统添加 5X 化合物

Step 4. 每 10 秒或 30 秒曝光一次, 持续 10-25 分钟

Step 5. 一般来说, 由于较低的动力学变化 Gi-偶联的受体实验需要更长的时间。FLIPR 参数设置见表 1.

Step 6. 数据结果从 FLIPR 的 ScreenWorks®软件输出到 Graphpad Prism 5 进行分析

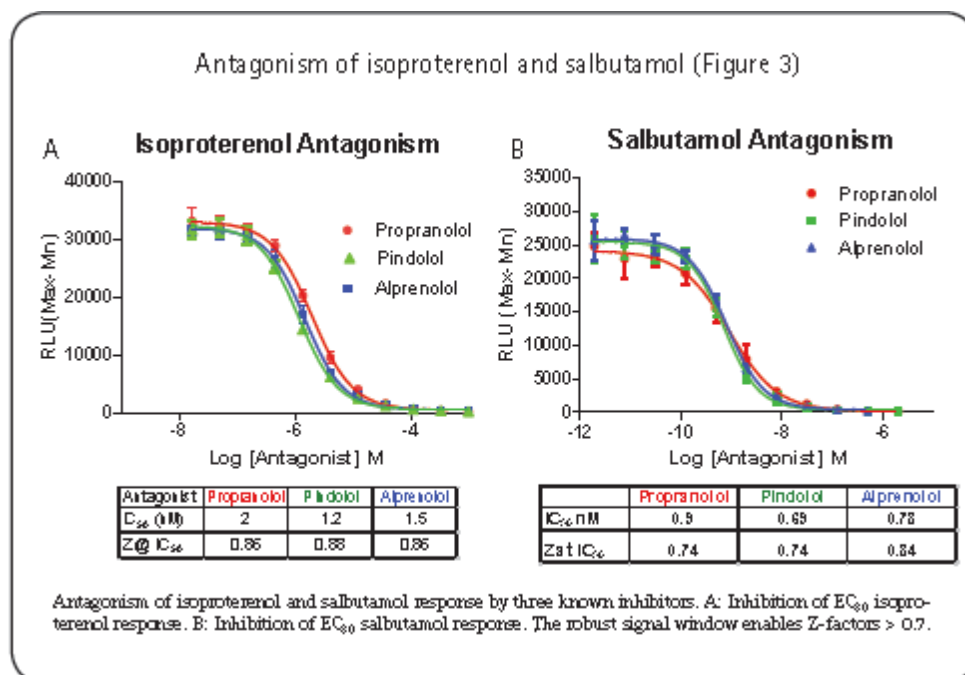
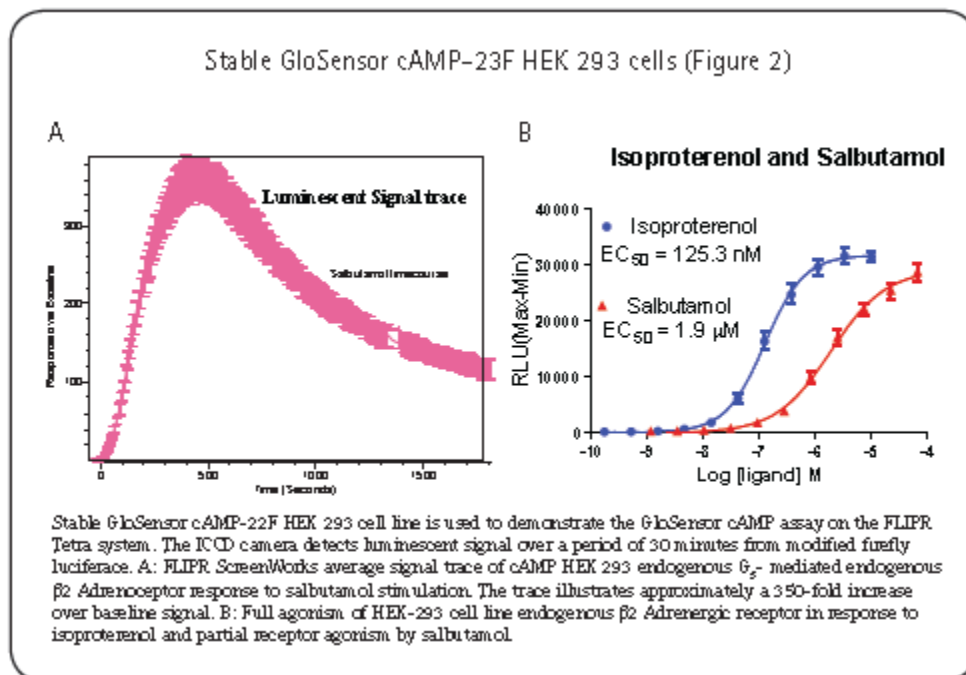
## GloSensor cAMP 瞬时转染方法用于稳定表达 GPCR 受体的细胞和内源性受体的细胞

- Step 1. 在培养瓶中不加抗生素条件下 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 过夜培养细胞，密度可达到 70-80%。
- Step 2. 在 Opti-Mem-无血清培养基中稀释 pGloSensor cAMP 质粒至 20 ng/mL，使得 step 4 中每毫升细胞体系中含 1- $\mu$ g DNA/mL (Life Technologies, Cat. #31985)。
- Step 3. 添加 Fugene HD 转染试剂混合物 (Roche, Cat. #0409705001)，比例是 3:1 每微克 DNA 并轻柔混合后室温下孵育 15 分钟。试剂( $\mu$ L) 与 DNA ( $\mu$ g)的比例是 3:1。
- Step 4. 添加 DNA 复合物至含 0.48 million per mL 细胞的离心管中(种植时 12000 cells/25  $\mu$ L/well for HEK-D4; 取决于细胞)。
- Step 5. 根据不同的细胞系，在每孔 2.5 微升体系中种植 8000-12000 个细胞，并在 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 2 天。
- Step 6. 实验当天，轻柔的去掉培养基并添加 30 $\mu$ L 2-6% f/v GloSensor cAMP 试剂至平衡液中。
- Step 7. 37°C 孵育 1 小时并在室温下放置 1 小时。
- Step 8. 参照表 1 中 FLIPR 系统的参数设置，在动力学检测过程中添加 6X 化合物。

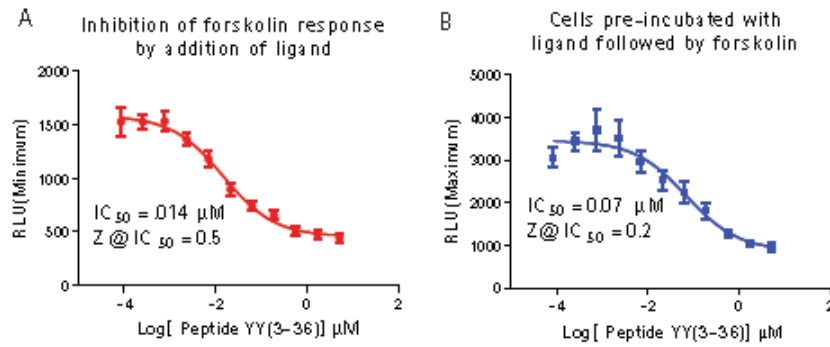
表 1: FLIPR Tetra System Setup Parameters	
参数	设置
ICCD Camera Mode	Luminescence
Gain	280,000
Gate	100%
No of Reads	60-180
Exposure Time*	1 Sec.
Read Interval	10 Second
Pipettor head	384-well with black tips
Aspirate volume	7.5 $\mu$ L
Dispense height	25 $\mu$ L
Dispense speed	30 $\mu$ L/sec

\* 最高 9 秒，如果发光信号强度低可以调整曝光时间。 实验条件需要根据实际结果进行优化。

# 结果

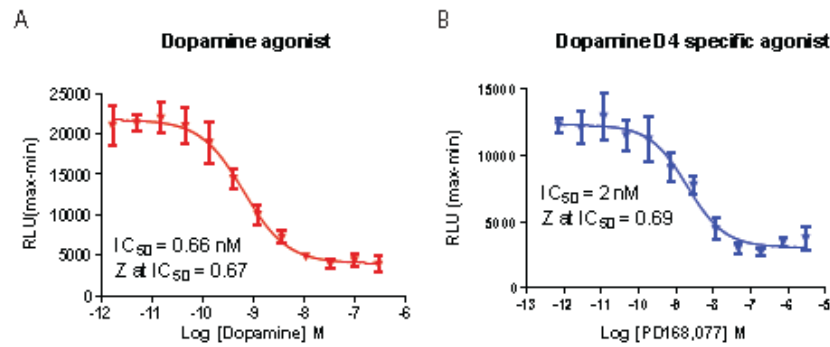


G<sub>i</sub>-coupled agonism results (Figure 4)



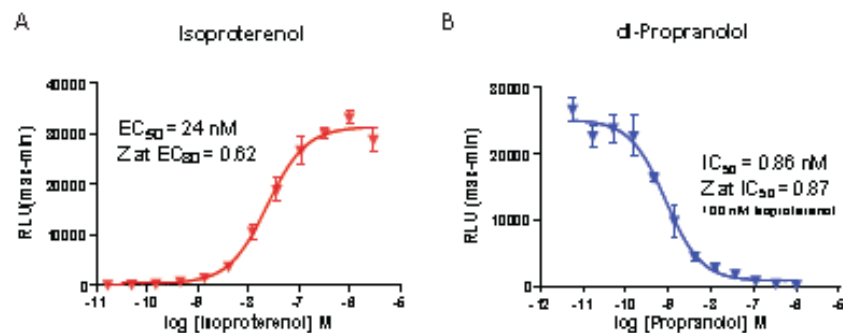
G<sub>i</sub>-coupled receptor agonism results in a reduction in signal correlated with reduction in cAMP inside the cell. Baseline increase in cAMP activity was induced by the addition of forskolin. Using stable P2Y receptor in CHO-K1 cells, we compared results upon addition of forskolin either before or after the agonist. A: 10 μM forskolin addition followed 15 minutes later by addition of agonist Peptide YY(3-36) on the FLIPR Tetra System. B: Peptide YY(3-36) was added 15 minutes prior to addition of 10 μM forskolin. In addition to assay flexibility, both methods illustrate a reduction in signal related to inhibited cAMP production.

HEK-293 cells over expressing G<sub>i</sub>-coupled D4 receptor (Figure 5)



HEK-293 cells over expressing G<sub>i</sub>-coupled dopamine D4 receptor from Multispan, Inc. were transiently transfected with GloSensor cAMP-22F plasmid. Ligand was added on-line to the wells, followed by 5 minute incubation. Continuing the assay, FLIPR Tetra System added 10 μM forskolin to stimulate cAMP production in the cell. A: Inhibition of forskolin mediated cAMP production by Dopamine. B: Inhibition of forskolin-mediated cAMP production by the Dopamine D4 receptor specific compound, PD168,077.

Transient transfection (Figure 6)



Transient transfection of GloSensor cAMP-22F and endogenous G<sub>i</sub>-coupled cAMP response in HEK 293 cells. (A) Response to isoproterenol and (B) inhibition of the response to 100 nM isoproterenol by propranolol. Results are comparable to those obtained from the experiment performed with the stable GloSensor HEK-22F cell line shown in Figure 2.

# 结论

GloSensor cAMP 实验在 FLIPR Tetra 系统上运行，进行 G<sub>i</sub>-和 G<sub>s</sub>-偶联的 GPCR 受体活细胞的高通量筛选应用。

基于 FLIPR Tetra 系统的 GloSensor cAMP 实验可以进行 G<sub>i</sub>-和 G<sub>s</sub>-偶联的 GPCR 受体的动力学检测而无需在酶标仪中进行终点法检测。

通过本篇应用文章，我们展示了使用 GloSensor cAMP 细胞系和 GloSensor cAMP 质粒转入内源性受体细胞的实验方法开发都很方便。

## Contact Us

Phone: +1-800-635-5577  
Web: [www.moleculardevices.com](http://www.moleculardevices.com)  
Email: [info@moldev.com](mailto:info@moldev.com)

Check our website for a current listing of worldwide distributors.

## Regional Offices

USA and Canada +1-800-635-5577  
Brazil +55-11-3616-6607  
China (Beijing) +86-10-6410-8669  
China (Shanghai) +86-21-3372-1088  
Germany 00800-665-32860

Japan (Osaka) +81-6-7174-8831  
Japan (Tokyo) +81-3-6362-5260  
South Korea +82-2-3471-9531  
United Kingdom +44-118-944-8000

