

应用 FLIPR 钾离子通道检测试剂盒对 hERG 通道阻断剂特性的分析

简介

药物诱导的 hERG (human ether-a go-go-related gene) 离子通道被阻断可能导致严重的致死性室性心律失常——尖端扭转型室性心动过速 (torsade de pointes, TdP)。近年来, 一批 FDA 已批准药物由于其对 hERG 的脱靶效应而被迫从市场上撤出。由此, 愈发凸显了在药物研发早期阶段开展候选药物 hERG 安全性筛选的重要性和快速增长的需求。本文重点阐述了一种新型钾离子通道检测试剂盒在 FLIPR^{TETRA} 高通量实时荧光成像分析系统上对 hERG 阳性化合物的效应进行了评估和检测。实验根据钾离子(K⁺)通道对铊离子(Tl⁺)的通透性, 采用了对铊离子敏感的荧光染料作为指示剂。实验对几种常见的 hERG 阳性抑制剂的药理效应进行了检测, 结果与 IonWorks Barracuda® Plus 全自动膜片钳系统得到的数值作比较。

材料和方法

FLIPR 钾离子通道检测试剂盒(图 1)含有铊离子敏感的指示染料。在开始染料加载步骤中, 含有乙酰氧基甲 (AM) 酯的铊离子指示染料通过被动扩散方式穿过细胞膜进入细胞内部。细胞质酯酶剪切掉乙酰氧基甲 (AM) 酯并释放出其激活的荧光形态。另外, 在细胞外采用了专利的屏蔽染料技术从而降低了背景荧光信号的干扰。可通过向细胞溶液中加入混合的 K⁺和 Tl⁺或包含了 Tl⁺的配体来激活钾离子通道。荧光信号的增强表明了铊离子特异性地通过钾通道进入细胞内, 从而对钾通道活性进行了功能性检测。

FLIPR 钾离子通道检测试剂盒(Molecular Devices cat. #R8222) 含有 Tl⁺敏感染料、屏蔽染料、200 mM K₂SO₄、50 mM Tl₂SO₄、5X 不含氯离子的缓冲液以及 HBSS + 20 mM HEPES 缓冲溶液。每个包装的试剂盒可以完成 10 块 96-, 384, 或 1536 孔板。实验检测流程见图 2。

化合物准备

疏水性化合物由于非特异性结合到化合物板等实验耗材中, 会影响到其显著的效能值。在本实验中, 化合物首先在 100%DMSO 中被稀释, 然后在实验前立即转移到含 HBSS + 20 mM HEPES 缓冲溶液的玻璃衬里的多孔板中

优势

- 在细胞水平实验中对钾离子通道活性进行功能性检测
- 均相免洗方法降低了孔间差异并简化操作流程
- 相比于非均相实验方法, 扩大了信号窗口

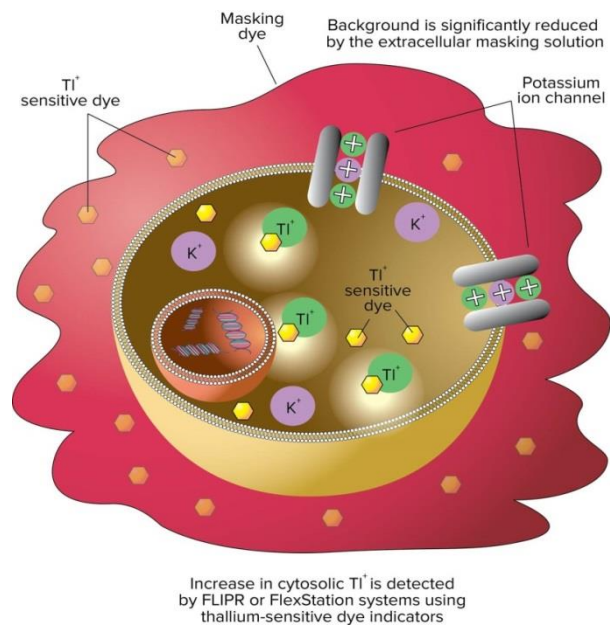


图 1. FLIPR 钾离子通道检测试剂盒原理

实验步骤

细胞稳定转染了人 Kv11.1 (hERG) 离子通道的中国仓鼠卵巢 (CHO) 由 ChanTest 公司 (Cleveland, OH) 提供。实验开始 2 天前在黑壁底透的 384 孔板中按照每孔 6500 个细胞的密度种植细胞, 培养基中包含了筛选抗生素并在 37 °C 和 5% CO₂ 条件下培养。实验前 24 小时生长培养基更换为含四环素的诱导培养基。实验前 4 小时细胞从 37 °C 转至 28 °C 条件下培养以增加 hERG 通道的表达。然后细胞板加入染料在室温下避光孵育一小时。

为进行药理学特性分析, 先加入 hERG 通道阻断剂并在室温下孵育 30 分钟。FLIPR^{Tetra} 系统在实验检测过程中向每个孔中加入之前优化好的缓冲液。系统采用了 470-495nm 的 LED 激发光源和 515-575nm 的发射滤片。为进行对比, 使用 FluxOR 试剂盒 (Life Technologies) 进行了平行实验。依照生产厂家提供的方案进行操作。数据采样间隔为 1 秒并持续 140 秒。结果导出到 GraphPad Prism 软件进行分析。

实验方案开发中首先取决于刺激 hERG 通道所需铯离子和钾离子浓度的优化。多孔板中放置多种浓度的 K₂SO₄ 和 Tl₂SO₄ 缓冲液。Tl⁺ 和 K⁺ 缓冲液用 1 倍浓度的不含氯离子的缓冲溶液稀释。由于每摩尔硫酸铯和硫酸钾含有 2 份的阳离子, 因而被看作为两倍的浓度进行处理。FLIPR^{Tetra} 系统在实验检测过程中向每个孔中加入刺激缓冲液。不同浓度诱发的信号曲线进行比较以确定最大信号对应的最优浓度值。结果显示, 产生最大 hERG 信号的最优 Tl⁺ 和 K⁺ 浓度分别是 1mM 和 10mM (图 3)。



图 2. FLIPR 钾离子通道检测试剂盒工作流程

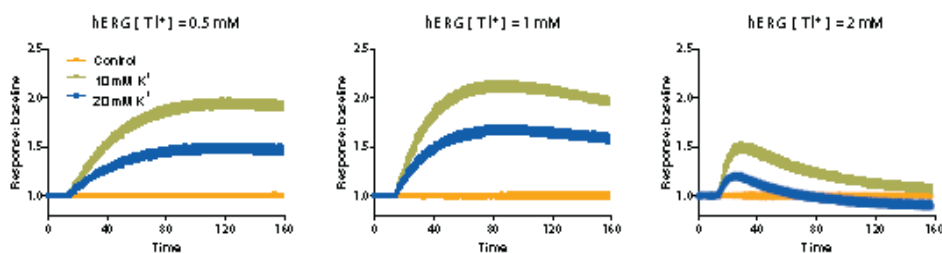


图 3. hERG 通道刺激条件优化。细胞加载染料后孵育, 然后 FLIPR^{Tetra} 系统在实验检测过程中向每个孔中加入刺激缓冲液。不同条件下对浓度依赖性的信号进行分析。结果显示, 产生最大 hERG 信号的最优 Tl⁺ 和 K⁺ 浓度分别是 1mM 和 10mM

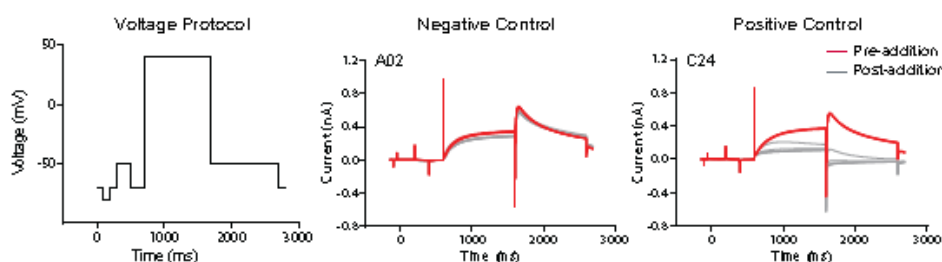


图 4. IonWorks Barracuda 电生理实验。化合物以 3 倍终浓度配制在含 1% DMSO 的细胞外液中并加入孔中混合稀释至终浓度, DMSO 含量稀释至 0.33%。化合物孵育 5 分钟, 然后施加电压刺激命令, 其中 +40mV 刺激电压持续 1 秒, 接着 -50mV 电压持续 1 秒以测定尾电流。

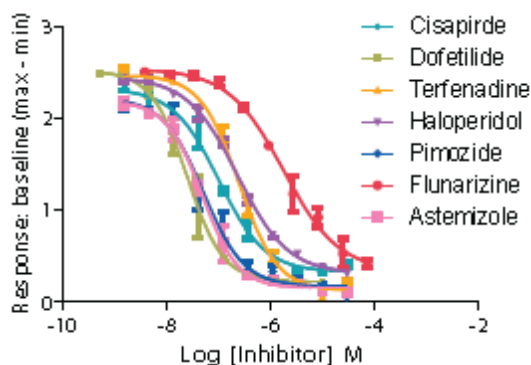


图 5. 阳性化合物对 hERG 通道的浓度依赖性阻断效应

电生理实验

为便于结果比较，所有同样的 hERG 通道阻断剂均在 IonWorks Barracuda¹ 全自动膜片钳系统进行了检测得到相应的 IC₅₀ 值（图 4）。为观察化合物的频率依赖性效应，电压刺激命令均以 0.1Hz 频率在加样前后分别刺激 5 次。第五个电流信号记录的 sweep 中 hERG 尾电流峰值被用来测定化合物效应。

结果

应用 FLIPR 钾通道检测试剂盒对七个已知的 hERG 阻断剂的效应进行评估。量效反应曲线见图 5。IC₅₀ 值与 IonWorks Barracuda 全自动膜片钳系统检测的 IC₅₀ 的比较见表 1 两者具有很好的相关性。

另外，其中 3 个化合物被用于评估比较另一种基于铯离子的试剂盒——FluxOR 钾离子通道试剂盒（图 6）。两者所得到的 IC₅₀ 值很接近，具体见表 2。然而，FLIPR 钾离子通道检测试剂盒的信号窗口是 2.25（基于信号与基线的比例），这一数值显著高于 FluxOR（信号窗口是 0.5）。表明了 FLIPR 钾离子通道检测试剂盒的实验结果更精确、更可靠。阴性对照是 4 μ M 特非那定对 hERG 通道的阻断效应，阳性对照是刺激性缓冲液对 hERG 通道的效应。更低的空间差异和更大的信号窗口产生了更大的 Z 因子值，见图 7。这可能源于 FLIPR 钾离子通道检测试剂盒是真正的均相实验体系且是免洗的或无需更换培养基，从而显著减小了孔间差异性。

Compound	ClogP	IC ₅₀ (nM)		Ratio
		FLIPR Tetra System	IonWorks Barracuda System	
Dofetilide	1.4	25	15.32	1.6
Astemizole	6.1	48	62	0.8
Pimozide	6.4	51	55	1.5
Cisapride	3.7	102	69	0.9
Haloperidol	3.8	237	81	2.9
Terfenadine	6.5	249	332	0.8
Flunarizine	5.4	1795	1000	1.8

表 1. FLIPR^{Tetra} 系统上源自 FLIPR 钾离子通道检测试剂盒的 IC₅₀ 值与 Barracuda 全自动膜片钳系统记录的电生理实验结果对比表。

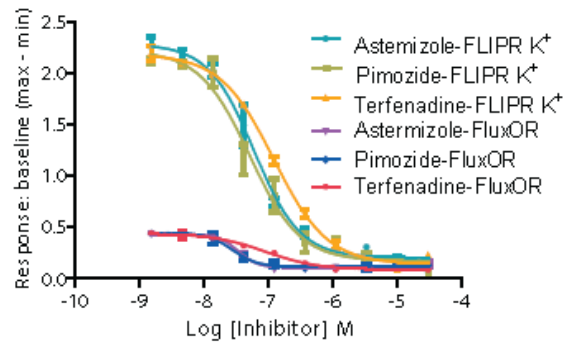


图 6. FLIPR 钾离子通道检测试剂盒与 FluxOR 结果对比

Compound	IC ₅₀ (nM)	
	FLIPR Potassium Assay Kit	FluxOR Kit
Astemizole	60	34
Pimozide	51	27
Terfenadine	121	90

表 2. 系统上源自 FLIPR 钾离子通道检测试剂盒的 IC₅₀ 值与 FluxOR 试剂盒的对比表

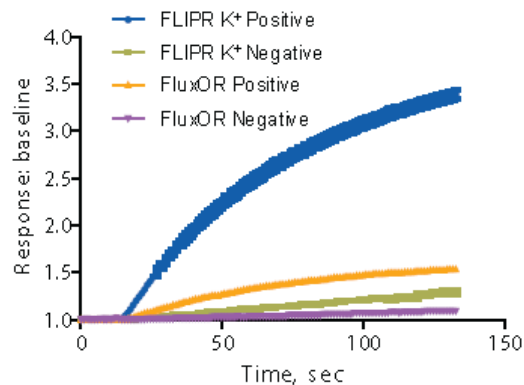


图 7. FLIPR 钾离子通道检测试剂盒的信号动态范围与 FluxOR 的对比。阴性对照是 4 μ M 特非那定；阳性对照是刺激性缓冲液。FLIPR 钾离子通道检测试剂盒的 Z' = 0.85, n = 32；FluxOR 的 Z' = 0.64, n = 30。

结论

FLIPR 钾离子通道检测试剂盒采用均相免洗的实验方案检测钾离子通道的功能活性。在本文中，我们应用了 hERG 通道阳性抑制剂验证了 FLIPR 钾离子通道检测试剂盒和电生理方法得到的结果是高度相关的。

在另一个单独运行的实验中，相比于其它同类型试剂盒来说，FLIPR 钾离子通道检测试剂盒表现出了显著性更高的信号窗口以及更高的 Z 因子值。明显提升的实验结果表现，结合 FLIPR^{Tetra} 系统的高通量性能，在药物研发早期阶段将为研究者提供一种强大的 hERG 风险评估分析平台。

参考文献

1. Karen Cook, James L. Costantin, and Xin Jiang, Validation of the IonWorks Barracuda System for hERG Ion Channel Assay, Application Note, 2011.
2. D. Rampe, et al, A mechanism for the proarrhythmic effects of cisapride (Propulsid): high affinity blockade of the human cardiac potassium channel HERG, FEBS Letters 1997; 417(1): 28-32.

Contact Us

Phone: +1-800-635-5577
Web: www.moleculardevices.com
Email: 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

