

如何使用SpectraMax® M5 多功能微孔板读板机和IMAP® 荧光偏振检测平台进行激酶活性的分析

SPECTRAMAX APPLICATION NOTE #6



By Cathy Olsen, Ph.D., Molecular Devices Corporation, 1311 Orleans Drive, Sunnyvale, CA 94089.

介绍

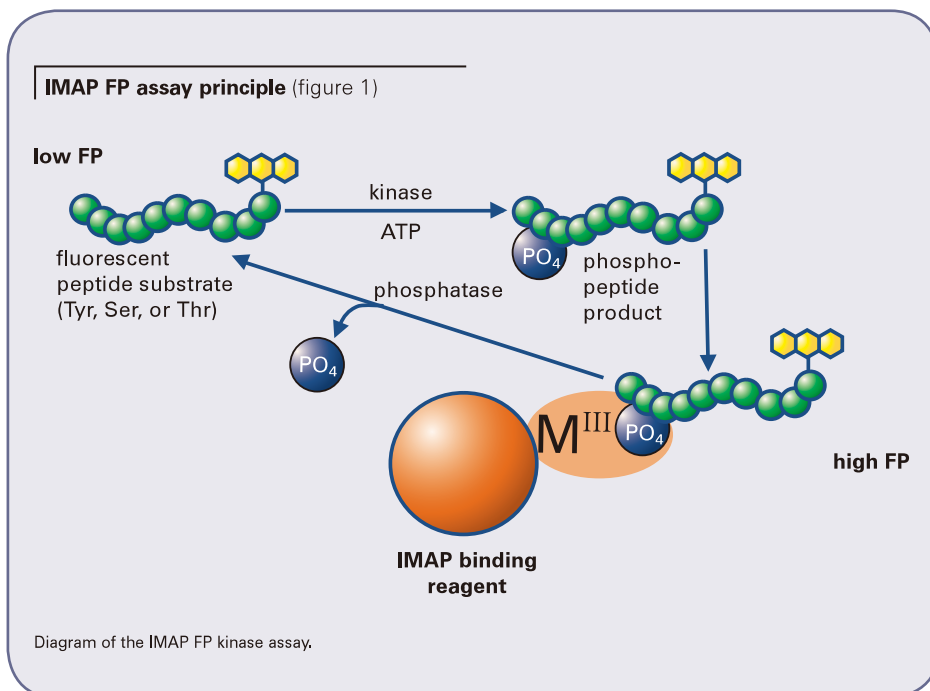
蛋白激酶在调节许多细胞反应过程时起着核心的作用。近年来已经成为癌症和其它许多疾病药物重要的作用靶点。IMAP是Molecular Devices公司推出一种快速、非放射性的激酶检测技术，由于技术本身特点其非常适合用于进行试验优化和高通量的筛选。IMAP检测技术基于的原理是磷酸根离子与表面固化的三价金属离子的纳米球颗粒的一种结合作用。当这种结合反应发生后，荧光标记的多肽分子的运动轨迹发生了改变，荧光标记复合物的荧光偏振值就会增加(See Figure 1.)。因为是一种均相的，可忽视底物多肽序列的一种检测方法，所以可广泛的应用于多种激酶的检测。

当使用IMAP技术进行试验优化和高通量的

筛选时，SpectraMax M5多功能微孔板读板机可作为其非常理想的、可靠的检测平台。SpectraMax M5是一种基于光栅型单色器的多功能微孔板读板机，允许使用者针对不同的荧光染料分子随意选择不同的检测波长，而无需额外再选购滤光片配件。这篇应用文章详细的描述了在进行IMAP荧光偏振激酶试验时，如何使用SpectraMax M5多功能微孔板读板机和SoftMax® Pro软件进行检测和分别对红色及绿色荧光底物来校正曲线。LCK是一种酪氨酸酶，在T细胞信号转导通路中发挥着非常关键作用，制备其稀释曲线。另外Akt1/PKBa，一种丝氨酸-苏氨酸激酶，参与磷脂酰肌醇激酶3的信号转导和细胞活力。通过十字孢碱抑制Akt1/PKBa的试验中，计算FAM和TAMRA分别标记的多肽底物在反应过程始中获得的Z'因子值，其结果与滤光片式多功能微孔板读板机上获得的结果相一致。

材料

- IMAP快速筛选试剂盒(Molecular Devices Cat. #R8125)
 - IMAP结合试剂
 - IMAP结合缓冲液A(5X)
 - IMAP结合缓冲液B(5X)
 - IMAP反应缓冲液(5X)
- LCK激酶(Upstate Cat. #14-442)
 - 标记FAM-p34cdc2多肽底物(Molecular Devices Cat. #R7157)
 - 标记TAMRA-p34cdc2多肽底物(Molecular Devices Cat. #R7309)
 - 标记FAM-p34cdc2来源的磷酸化多肽校正试剂(Molecular Devices Cat. #R7271)
- Akt1-PKBa激酶(Upstate Cat. #14-276)
 - FAM标记多肽底物(Molecular Devices Cat. #R7110)
 - FAM标记的磷酸化多肽底物(Molecular Devices Cat. #R7159)



- 贮存在纯水中的50 mM Adenosine 5' triphosphate (ATP)(Sigma Cat. #A6559)
- 贮存在纯水中的100 mM DL-Dithiothreitol (DTT)(Sigma Cat. #D9779)
- 十字孢碱 (Staurosporine) Biomol Cat. #EI-156)
- 黑色聚苯乙烯材质的384孔板(Corning Cat. #3710)
- 预装有SoftMax Pro软件电脑及连接SpectraMax M5 多功能微孔板读板机 (Molecular Devices)

方法
激酶反应

步骤1.在1xIMAP反应缓冲液中加入DTT,并使DTT得终浓度达到1mM(1:100稀释100mM的DTT贮存液),得到完整的反应缓冲液(CRB);

步骤2.在CRB中制备400nM(4x)的FAM或TAMRA标记的多肽底物(1:50稀释原20uM的多肽贮存液);

步骤3.在CRB中制备20uM(4x)的ATP(1:2500稀释原50mM的ATP贮存液);

步骤4.准备一份终浓度为4x的酶梯度稀释液。对于激酶抑制剂试验,使用恒定浓度的酶,并制备出一组十字孢碱或其它激酶抑制剂的梯度稀释液。

步骤5.将下列试剂平行的加入4个复孔的激酶反应体系中:

- 5ul CRB或十字孢碱
- 5ul酶(对于没有添加酶的背景孔,加入5ul CRB作为替代)
- 5ul 20uM的ATP贮存液
- 5ul 400 nM的多肽贮存液

步骤6.室温孵育1到1.5小时。

Note: 如需获得更为详尽的说明,请参考IMAP product insert 1.另外,对于多种激酶的试验数据也可以登录以下网址进行查寻 <http://www.moleculardevices.com/assayarchive/>

校准标准品的制备

步骤1.在CRB中制备一份100nM的多肽贮存液(使用与激酶试验中相同的底物);

步骤2.在CRB中制备一份100nM的磷酸多肽贮存液(使用与激酶试验中相同的磷酸化底物);

步骤3.如图表1所示将多肽和磷酸化多肽贮存液按照一定规律混合后,制备校正标准品。样品量足够4个复孔所需;

步骤4.各移出20ul校正标准品到4个复孔中,包括一组只有20ul CRB的空白背景样本。

Calibration Standard (% Phosphorylated)	µL Peptide Stock	µL Phospho-peptide Stock
0	100	0
12.5	87.5	12.5
25	75	25
50	50	50
100	0	100

Note: 更多校正曲线配制及使用信息,请参考IMAP Application Note #4, Developing Calibration Curves for IMAP2.

结合反应

步骤1.将75%的结合缓冲液A与25%的结合缓冲液B混合,制备结合缓冲液;

步骤2.将结合试剂以1:600倍稀释成结合缓冲液,得到结合反应液;

步骤3.移出60ul结合反应液到每个检测孔和校正标准孔中(包括背景孔样本)

步骤4.室温避光孵育1小时;

在SoftMax Pro软件上设置模板,并在SpectraMax M5多功能微孔板读板机上进行读数

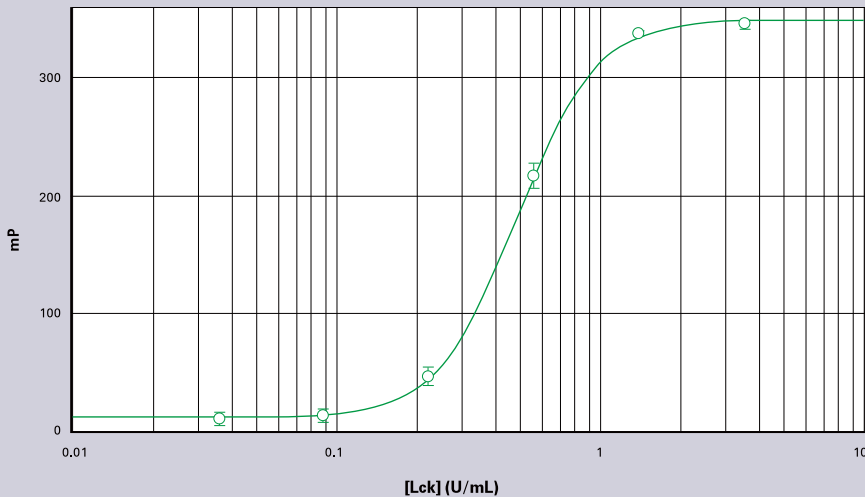
Note: FAM和TAMRA标记底物的IMAP荧光偏正实验的模板在SoftMax Pro 5软件上已预设好,详见Binding Assays模板文件夹。

步骤1.打开SoftMax Pro软件上针对荧光素使用的IMAP 荧光偏振模板。FAM和TAMRA模板已预设好;如果使用的不是FAM和TAMRA荧光素,只需调整波长设置即可。对于SpectraMax M5多功能微孔板读板机上的参数设置见图表2。

Read type		Endpoint	
Read mode		Fluorescence polarization	
Wavelengths	FAM	TAMRA	
	Ex 485 nm	Ex 530 nm	
	Em 525 nm	Em 590 nm	
	Cutoff 515 nm	Cutoff 570 nm	
Sensitivity	Readings: 100 PMT: high or medium		
Autonix	Off		
AutoCalibrate	On		
Assay plate type	384-well Costar black		
Wells to read	[Determined by user]		
Settling time	Delay: 100 ms		
AutoRead	Off		

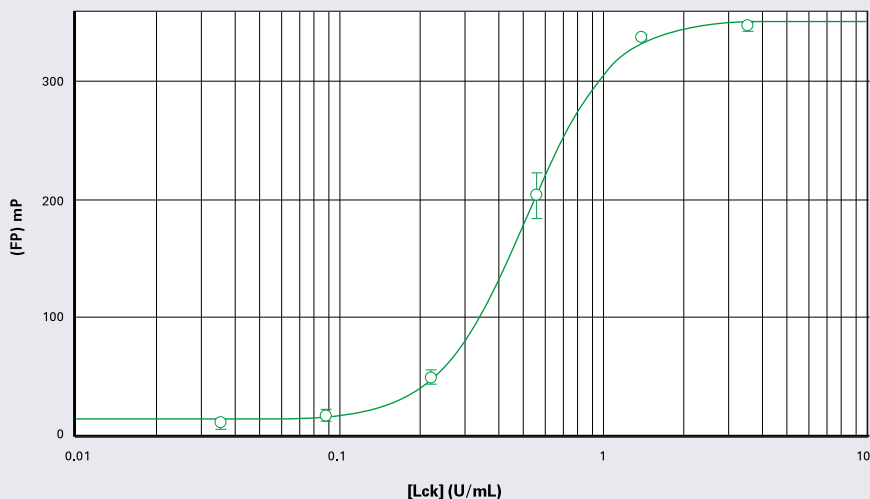
步骤2.设置一个试验模板,选定背景样本孔、激酶样品本孔、校正标准品孔。激酶试验样品和校正标准品可分到SoftMax Pro软件模板上预设好的8个样本组中。在计算最小偏振值(mP)之前,首先将只含有缓冲液的质控品分到相应的背景组中后,使用软件自动扣除其背景荧光值。

IMAP-FP kinase assay on SpectraMax M5 (figure 2)



Lck kinase dilution curve with FAM-p34cdc2-derived peptide from 0.04 to 3.5 units/mL enzyme, read on SpectraMax M5 (4-parameter curve fit). Error bars here and on all subsequent graphs are standard deviations.

IMAP-FP kinase assay on Analyst HT (figure 3)



Lck kinase dilution curve with FAM-p34cdc2-derived peptide from 0.04 to 3.5 units/mL enzyme, read on Analyst HT (4-parameter curve fit).

步骤3.把微孔板放到读板机里后---确保紫色托架（适配器）放置在微孔板托架上---然后点击Read读板。

结果

SoftMax Pro软件中预置的IMAP 荧光偏振模板会自动计算出水平偏振均值和垂直偏振均值(mP值), 总的荧光强度, 标准方差和CV值。每一组试验样品的组群一栏中, 模板会自动扣除背景样品的荧光偏振值, 然后计算出最小偏振mP值。也可根据相应的校正曲线计算出样品磷酸化比率。(See IMAP Application Note #4, “Developing calibration curves for IMAP”)

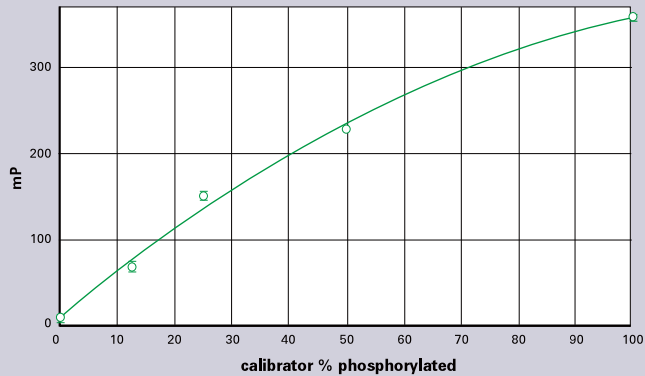
图表2显示了使用 FAM-p34cdc2多肽获得的一条LCK激酶的稀释度曲线。当用 SpectraMax M5微孔板读板机检测时, 得出酶的浓度范围从0.04至3.5 units/ml, 最小偏振值为303, 同时Z'因子的值为0.87。图表3显示了使用Analyst HT多功能读微孔板读板机检测相同孔时, 荧光偏振值为336, Z'因子的值为0.95。两台仪器得到的EC50值均为0.5 units/ml。

如果使用非磷酸化和磷酸化的多肽样品作为质控分别做一条校正曲线, 可以将荧光偏振值以百分比形式显示, 得出其磷酸化程度。(See Figure 4.)首先建立一条新的曲线(软件默认名称为Graph#1), 分别使用荧光偏振值(mP值)相对磷酸化百分比(浓度)作为你的质控样品组绘制一条曲线。曲线默认名称为“Plot#1.”在校正标准品组栏里, 新建一列后输入下面的公式, 即: $\text{InterpX}('Plot\#1@Graph\#1@IMAP\ FP_FAM', \text{AvgbkgsbpmP})$ 。并用'IMAP FP_FAM'作为试验名称。

为了确定使用红色荧光染料进行IMAP激酶试验的效果，另一个LCK激酶稀释曲线结果的获得来源于TAMRA-p34cdc2多肽。(See Figure 5.)使用SpectraMax M5微孔板读板机检测结果，酶的浓度范围是从0.04到3.5 units/ml，荧光偏振值(mP值)为258，同时Z'因子的值为0.95。在Figure 6中，相同的试验使用Analyst HT微孔板读板机进行检测后，荧光偏振值

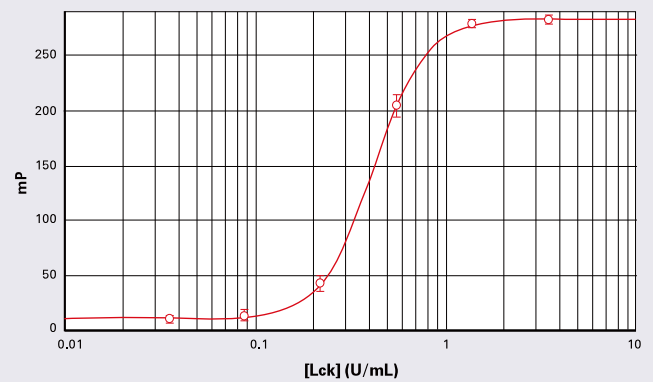
(mP值)结果为270，同时Z'因子的值为0.93。两个读板机得到的EC50值都为0.4 units/ml，与FAM标记的底物获得结果相一致。同样也建立了一条相关的校正曲线(See Figure 7.)，TAMRA和FAM相近的结果也可以让用户利用红色荧光染料给我们带来的优势，即能够尽可能降低化合物产生的背景荧光。

IMAP with FAM-labeled peptide (figure 4)



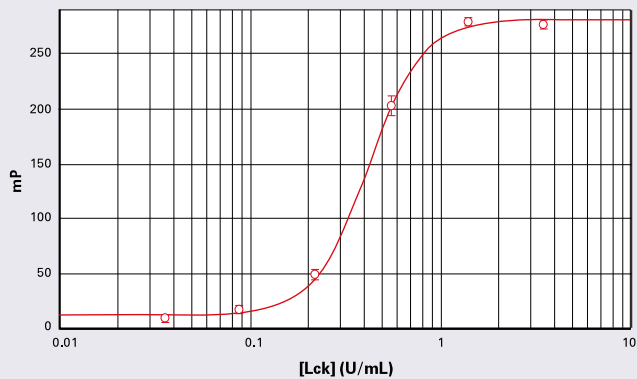
Calibration standard curve with FAM-p34cdc2-derived peptide and phosphopeptide, read on SpectraMax M5 (quadratic curve fit).

Lck kinase assay with TAMRA-labeled peptide on SpectraMax M5 (figure 5)



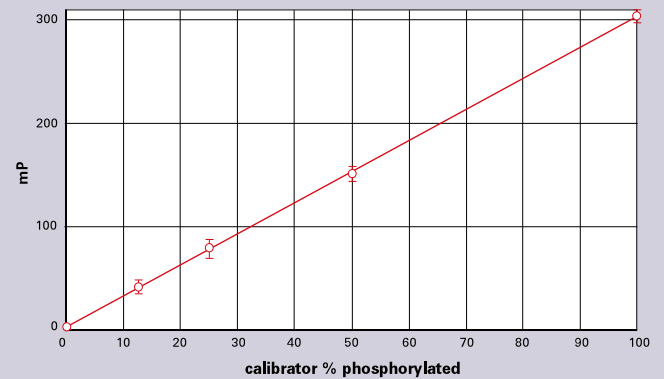
Lck kinase dilution curve with TAMRA-p34cdc2-derived peptide, read on SpectraMax M5 (4-parameter curve fit).

Lck kinase assay with TAMRA-labeled peptide on Analyst HT (figure 6)



Lck kinase dilution curve with TAMRA-p34cdc2-derived peptide, read on Analyst HT (4-parameter curve fit).

IMAP with TAMRA-labeled peptide (figure 7)



Calibration standard curve with TAMRA-p34cdc2-derived peptide and phosphopeptide, read on SpectraMax M5 (linear curve fit).

总结

随着研究人员努力去探究激酶在细胞信号转导通路和各种疾病中扮演的角色，以及在许多疾病治疗中发挥的调节机制，他们越来越希望获得非放射性的、均相的检测方法，可用于试验优化和高通量药物的筛选。荧光偏振试验可提供一种均相的、高通量的方式来鉴定各种激酶的激活剂、抑制剂和底物。使用SpectraMax M5多功能微孔板读板机进行IMAP荧光偏振检测：获得的结果精确性高、重复好、Z'因子值高，双光栅型单色器系统方便使用者选择

不同荧光染料标记的多肽底物进行试验优化，而无需额外的在选购滤光片。此外，无论是用绿色或者红色荧光染料标记的底物进行IMAP荧光偏振激酶试验，获得的结果都与使用滤光片型单色器的微孔板读板机上的检测值相一致。最后，SoftMax Pro软件上预设的IMAP 荧光偏振模板为荧光偏振数据的采集和分析提供了一种更为方便的方式，并且这些模板也可用于不同荧光染料分子的检测。

参考

1. IMAP Akt Assay Kit Product Insert (Molecular Devices product #R8058).
2. Developing calibration curves for IMAP (IMAP Application Note #4).
3. Zhang, J.H., Chung, T.D.Y., and Oldenburg, K.R. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of highthroughput screening assays. *J Biomol Screen* 4 (2): 67-73.

