

# 在 FlexStation 3 多功能酶标仪上使用 FLIPR 钾离子通道检测试剂盒鉴定 hERG 通道阻滞剂

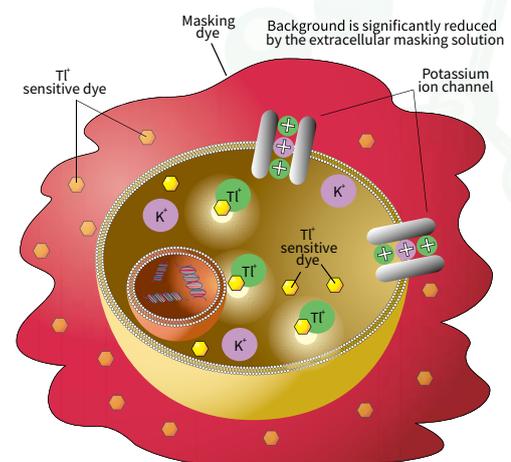


## 简介

药物诱导的人类 hERG 离子通道阻滞与患者潜在的致死性室性快速心律失常的易感性有关。近年来，FDA 批准的一些药物由于对 hERG 的脱靶作用而退出市场。因此，在药物发现过程的早期阶段，迫切需要鉴定能够阻断 hERG 通道的化合物。在此，我们展示在 FlexStation 3 多功能酶标仪上，一种新的钾离子通道检测试剂盒研究 hERG 化合物活性的用途。这种分析方法利用了铊离子 ( $Tl^+$ ) 的渗透性，通过钾离子通道进入胞质，然后被一种新型荧光指示剂检测到。7 种参照的 hERG 阻滞剂在中等通量细胞试验中进行检测，并将 FLIPR Tetra System 和 IonWorks Barracuda Plus Automated Patch Clamp System 收集的数据值进行比较。

## 优点

- 细胞水平的钾离子通道活性的功能测定
- 均相免洗特性可降低孔间差异并简化操作流程
- 相比于非均质化实验，扩展了信号窗口



通过使用铊敏感染料指示剂在 FLIPR 或 FlexStation 系统上检测胞质  $Tl^+$  的增加

图 1 FLIPR 钾离子通道检测试剂盒的原理。

## 材料和方法

FLIPR 钾离子通道检测试剂盒 (图 1) 含有对铊敏感的指示剂。在起始的染料加样步骤, 铊离子指示剂以乙氧基甲基酯 (AM) 的形式通过被动扩散穿过细胞膜进入细胞内。细胞质的酯酶可切割 AM 酯并释放其活性荧光构型。此外, 一种具有专利的掩蔽染料应用于细胞外以降低背景荧光。细胞被钾离子和铊离子的混合物或铊离子存在下的配体刺激, 可以激活钾离子通道。荧光信号的增加表示铊离子流入细胞内, 确切地说是通过钾通道流入, 因此显示了钾离子通道功能性的活性测量。FLIPR Potassium Assay Explorer Kit (Molecular Devices Cat# R8222) 试剂盒包含铊离子敏感的染料, 掩蔽染料用于均质化操作, 200 mM 硫酸钾, 50mM 硫酸铊, 5x 无氯缓冲液, HBSS + 20 mM HEPES 缓冲液。此试剂盒支持 10 块 96 孔或 384 孔板。实验流程如图 2。

### 制备化合物

化合物的疏水性质影响表观效力值, 可能是由于与实验器具的非特异性结合。在这项研究中, 化合物首先在 100% DMSO 中稀释, 然后在检测前立即与 HBSS + 20 mM HEPES 缓冲液一同转移至玻璃内衬的聚丙烯板中。

### 实验流程

人 hERG 离子通道基因 Kv11.1 稳定转染的 CHO 细胞, 由 ChanTest Corporation (Cleveland, OH) 公司提供。在实验

前两天, 以 25000 个细胞 / 孔的密度将细胞种在黑色透明底的 96 孔板中, 加入含有选择抗生素的生长培养基并在 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 环境下孵育。在实验前的 24 小时, 将生长培养基换成含有四环素的诱导培养基。实验前的 4 小时, 将细胞孵育温度从 37°C 切换到 28°C, 以增强细胞膜上 hERG 离子通道的表达。微孔板细胞与染料一起在室温下避光孵育 1 小时。

药理学分析时, 首先加入 hERG 通道阻滞化合物, 室温孵育 30 分钟。在 FlexStation 3 酶标仪检测时, 添加先前优化过的刺激缓冲液至每个孔中。在 SoftMax Pro 软件中设置激发波长 485nm, 发射波长 538nm。每列的信号采集大约 120 秒, 间隔 1.52 秒。为了进行对比, 使用 FluxOR Assay Kit (Life Technologies) 试剂盒, 按其实验手册进行平行试验。数据分析在 SoftMax Pro 软件和 GraphPad Prism 软件中完成。

通过确定刺激 hERG 通道所需的铊和钾的最佳浓度进行实验方法的开发。在微孔板中测试不同浓度组合的硫酸钾和硫酸铊的刺激缓冲液, 铊离子和钾离子缓冲液使用 1x 无氯缓冲液稀释。硫酸铊和硫酸钾每摩尔有两倍量的阳离子, 因此我们认为它们的阳离子浓度是各自浓度的 2 倍。检测时, 将刺激缓冲液加入孔中的细胞, 比较不同浓度组合的信号轨迹, 以确定提供最大信号的最佳浓度组合。使用 FLIPR Tetra System 得到的数据显示, 能够刺激 hERG 并提供最大信号的最优或最终的铊离子浓度是 1 mM, 钾离子浓度时 10 mM。

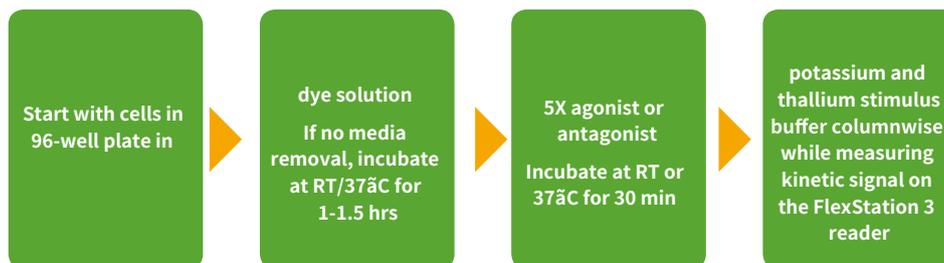


图 2 在 FlexStation 3 酶标仪上, FLIPR 钾离子通道检测试剂盒的工作流程。

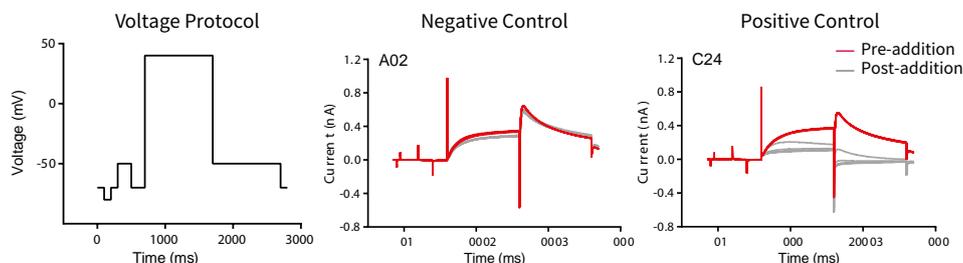


图 3 在 IonWorks Barracuda System 上的电生理实验。将化合物以 3x 的浓度加入 1% DMSO 中, 再在孔中与缓冲液混合, 稀释至终浓度为 1x 的化合物于 0.33% DMSO。化合物孵育 5 分钟后, 按如下电压操作, +40 mV 刺激一秒, 随后一秒至 -50 mV, 测量峰值尾电流。

## 电生理

为了进行比较, 从 IonWorks Barracuda 全自动膜片钳系统获得了同一组 hERG 通道阻断剂的 IC<sub>50</sub> 值 (图 3)。为了捕获化合物使用依赖性的效应, 在化合物添加前后, 施加 5 次 0.1 Hz 的电压。hERG 尾电流在第五次扫描时的峰值振幅被用来测量该化合物的效应。

## 结果

在 FlexStation 3 酶标仪上使用 FLIPR 钾离子通道检测试剂盒鉴定七个已知的 hERG 通道阻滞剂。化合物的浓度响应曲线如图 4。在 FLIPR Tetra System、IonWorks Barracuda System 两套系统上得到的 IC<sub>50</sub> 值进行对比, 如表 1 所示。这三种检测系统中的 IC<sub>50</sub> 值在半对数 (1/2log) 范围内有较好的相关性, 化合物效价的排序保持不变。

另外, 有四个化合物被用来评估基于铯离子的参照实验试剂盒 (FluxOR 钾离子通道实验) 的性能 (图 5)。除了西沙必利 (cisapride) 之外, 实验获得的 IC<sub>50</sub> 值都是相似的, 如表 2 所示。西沙必利通过 FLIPR 钾离子通道检测试剂盒得到的 IC<sub>50</sub> 值更接近于 FLIPR Tetra System。IonWorks Barracuda System 两套系统得到的值。FLIPR 钾离子通道检测试剂盒提供的平均信号窗口约为 225% (% 确定为基线) 明显高于 FluxOR 试剂盒的平均值 90%, 每组 8 个样本。为了进行统计分析, 能完全阻断 hERG 通道响应的 4μM 特非那定 (terfenadine) 作为阴性对照, 阳性对照选择引起最大的 hERG 通道响应的刺激缓冲液。FLIPR 钾离子通道检测试剂盒获得的更高 Z 因子得益于更低的孔间变异性和更宽的信号窗口 (图 6)。这可能是因为 FLIPR 钾离子通道检测试剂盒是一种真正的均质性检测实验, 不需要清洗步骤或更换介质, 因此具有更低的孔间变异性。

## 结论

FLIPR 钾离子通道检测试剂盒使用均质化、无需清洗的操作方案来测量钾离子通道的功能活性。此研究中, 我们使用一系列的参照的 hERG 阻滞剂来证明 FlexStation 3 酶标仪的获得的结果与使用 FLIPR Tetra System 和电生理方法产生的数据具有强烈的相关性。

另一组实验中, FLIPR 钾离子通道检测试剂盒相比于竞争试剂盒产品, 显示了明显更大的试验窗口和更高的 Z 因子。改进的试验质量联合 FlexStation 3 多功能酶标仪的中等通量能力或者 FLIPR Tetra System 的高通量能力, 能够在药物发现的早期过程为 hERG 的特征分析提供一个有力的平台。

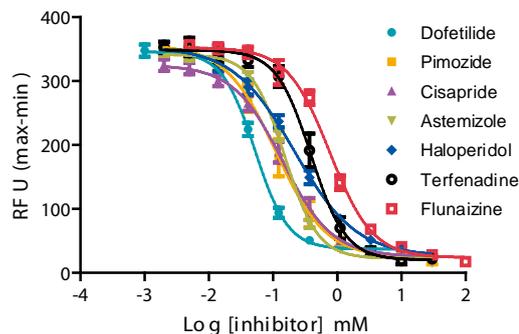


图 4 阻断 hERG 通道活性的代表性化合物的浓度响应曲线。在 FlexStation 3 酶标仪上收集得到数据。

Compound	IC <sub>50</sub> (nM) FlexStation 3 reader	IC <sub>50</sub> (nM) FLIPR Tetra System	IC <sub>50</sub> (nM) IonWorks Barracuda System	Ratio FlexStation 3/ IonWorks Barracuda System
Dofetilide	53	25	15.3	3.5
Pimozide	111	51	55	2.0
Cisapride	142	102	69	2.1
Astemizole	153	48	62	2.5
Haloperidol	219	237	81	2.7
Terfenadine	391	249	332	1.2
Flunarizine	858	1795	1000	0.9

表 1 FLIPR 钾离子通道检测试剂盒, 在 FlexStation 3 酶标仪、FLIPR Tetra System、IonWorks Barracuda System 三套系统上得到的 IC<sub>50</sub> 值进行对比。

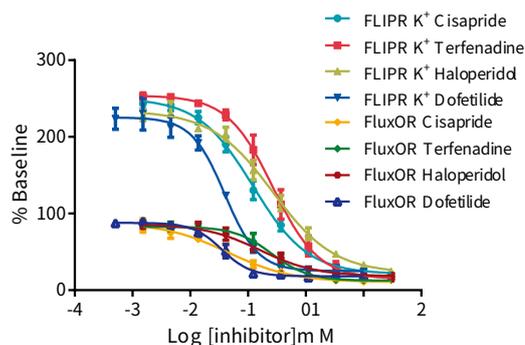


图 5 FLIPR 钾离子通道检测试剂盒的结果与竞争者试剂盒相比较。

Compound	IC <sub>50</sub> (nM) FLIPR Potassium Assay Kit	IC <sub>50</sub> (nM) FluxOR Kit
Dofetilide	35	39
Cisapride	122	449
Haloperidol	269	162
Terfenadine	269	257

表 2 FLIPR 钾离子通道检测试剂盒与竞争试剂盒的 IC<sub>50</sub> 结果比较。

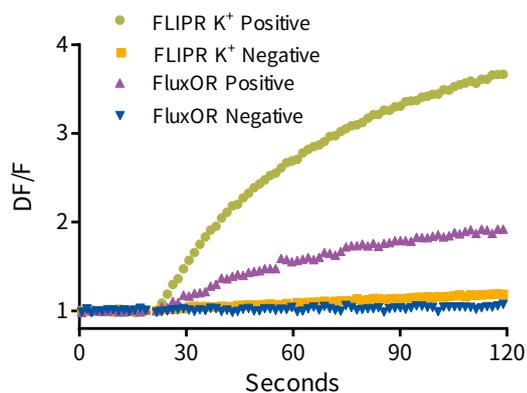


图6 FLIPR 钾离子通道检测试剂盒的信号动态范围与竞争者试剂盒相比较。4  $\mu\text{M}$  特非那定作为阴性对照，刺激缓冲液作为阳性对照。FLIPR 钾离子通道检测试剂盒的 Z factor = 0.67, n = 8; 竞争试剂盒的 Z factor = 0.43, n = 8。

可与如下的 Molecular Devices 产品兼容。



FlexStation 3 Multit-Mode Microplate Reader



FLIPR Tetra High Throughput Cellular Screening System

### 参考文献

1. Characterization of hERG channel blockers using the FLIPR Potassium Assay Kit, Application Note, 2015.
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.
3. Karen Cook, James L. Costantin, and Xin Jiang, Validation of the IonWorks Barracuda System for hERG Ion Channel Assay, Application Note, 2011.



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: 台北市内湖区瑞光路 631 号 4 楼  
地址: 香港中环皇后大道中 15 号置地广场 公爵大厦 21 楼

