

第二代高通量药物筛选平台更容易发现磷脂酰肌醇信号通路低亲和力抑制剂

EJ Dell¹, JL Tardieu², F. Degorce², Michael Fejtli¹

¹ BMG LABTECH Inc. NC, USA edward.dell@bmglabtech.com

² Cisbio Bioassays, 30200 Codolet, France



关键词: 高通量, 药物筛选, HTS, HTRF, Cisbio, BMG Labtech, PHERAstar FS, 磷脂酰肌醇信号通路, 低亲和力, 抑制剂, G-蛋白偶联受体, GPCRs

摘要:

通过传统的高通量药物筛选平台 (HTS) 所发现的可市场化的药物不仅数量少, 而且市面上大部分的药物都是小分子量 (<500Da) 物质。这似乎说明, 运行于更低体积和更低浓度下的传统高通量药物筛选平台, 错失了发现更低亲和力药物的机会。

市场的需求催生了下一代高通量药物筛选平台——来自德国BMG LABTECH公司的PHERAstar FS, 以光电倍增管 (PMT) 检测技术为核心的多功能微孔板检测仪。与来自另一品牌在行业中处于领导地位的以CCD相机为技术核心的微孔板检测仪进行平行测试。数据显示, PMT微孔板检测仪 (PHERAstar FS) 比CCD微孔板检测仪具有明显的性能优势: 超过2倍的读数速度已经更加卓越的分析质量参数。更重要的是, PMT微孔板检测仪 (PHERAstar FS) 检测出几个CCD检测仪不能发现的更低亲和力的药物“靶点”。PHERAstar FS, 作为新的高通量药物筛选的黄金标准, 将是传统高通量药物筛选中用于发现低亲和力复合物的代表性选择。

数据显示, PMT微孔板检测仪与CCD微孔板检测仪相比:

发现几个更低亲和力的药物 “hits” (活性化合物)

更好的Z', 分析窗和 Δ F%

2 倍以上的检测速度

实例分析:

在这里, 我们采用的是 Cisbio 公司生产的 IP-One HTRF® 分析——该方案检测更低应答的胞内第二信使磷酸肌醇 (IP1), 磷酸肌醇是三磷酸肌醇 (IP3) 的下游代谢产物。我们同时对比了两种不同的高通量筛选微孔板检测仪 (PHERAstar FS 和来自另外一个品牌的微孔板检测仪) 对磷脂酰肌醇信号通路低亲和力抑制剂的检测结果来评估两种药物筛选技术。

背景知识:

G-蛋白偶联受体(GPCRs)为跨膜蛋白, 是介导细胞外刺激信号的关键角色。**GPCRs**与胞内一系列复杂的复合物相互作用调控非常大量的下游效应物质。其产物三磷酸肌醇(IP3)是其中一个第二信使, 是对Gq-蛋白偶联受体被激活的应答而产生的。然而, IP3的半衰期非常短, 对于药物筛选而言, 是很难对其进行测定的。因此, 对由IP3触发的钙释放的监测, 作为该信号通路的下游信号被广泛应用。另外一个监测IP3的方法是检测磷酸肌醇 (IP1) 的累积, 磷酸肌醇 (IP1) 是三磷酸肌醇 (IP3) 的下游代谢产物。

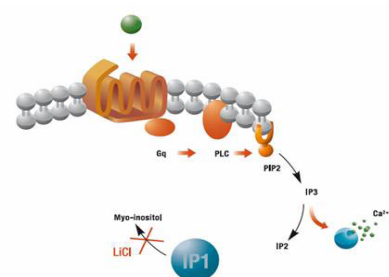


图 1.IP1 的生物合成路径

利用IP1的稳定性和在细胞内的可累积性的优点，采用IP1单克隆抗体制备优化的均相时间分辨荧光 (HTRF®) 分析方法。HTRF® IP-One分析方法已经与多种现存的方法相比较且得到相似的复合效能数据，且在终点累积的IP1可用于测定缓作用复合物的作用，这个是钙流测定没办法做到的。HTRF® IP-One分析方法同时可通过定量组成性激活的G蛋白受体来测定反向激动剂，这是测定钙释放的方法所不能做到的。最后一点，HTRF® IP-One检测方法具有比钙流检测方法更好的分析稳健度和更低的假阳性。IP-One分析方法是Cisbio Bioassays在其专利HTRF®技术上开发出来的。(图2)。

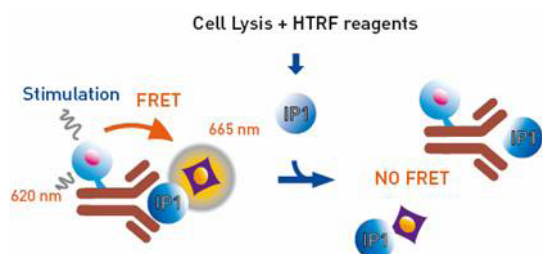


图2: IP-One HTRF 分析原理图

该分析方法采用与 IP1 特异性结合的单克隆抗体，其原理是基于胞内累积的 IP1 与其竞争性结合从而抑制了 HTRF®供体和受体之间的荧光共振能量转移 (FRET)。建立一个 IP1 标准校正曲线可用于计算因复合物作用而引起的胞内累积的 IP1 的浓度，从而相应得到了复合物的浓度。

材料和方法:

黑色1536-孔微孔板，来自于Greiner公司

下一代PMT微孔板检测仪——**PHERAstar FS**，来自于德国**BMG LABTECH**公司

高通量CCD微孔板检测仪来自于另外生产商

PHERAstar FS 配备高能脉冲氮分子激光，发射波长为 337nm，同时配备了专用的同时双发射 (SDE) 直接光子测定时间分辨荧光模式。当激发铽(Tb)受体分子时，激光比宽光波段的氙闪灯具有更高的效率。与铕(Eu)相比，激光的高能量使得激发峰在 337nm 左右的铽穴合物有更高的分子激发效率。Greiner 的 1536-孔微孔板用于 5μL 体系的分析。如图 3 所示，1408 个不同的复合物移液到微孔板的前 44 列中，阳性对照(POS,n=64)和阴性对照(NEG, n=64)移液到最后 4 列中。



图 3: BMG LABTECH 多功能酶标仪 PHERAstar FS

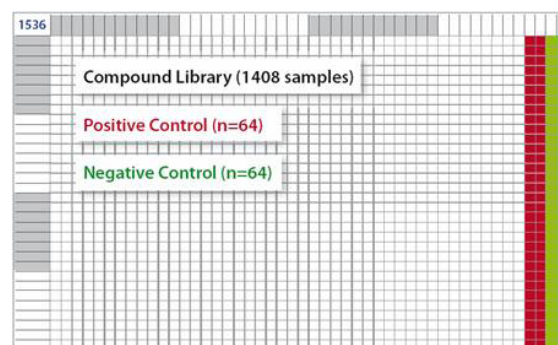


图4: 1536-孔微孔板布局

结果与讨论:

通过计算两个发射波长(Em 665 nm / Em 620 nm) 下的HTRF®比率来评估分析结果，1536微孔板的3维表面图的尖峰表示得到的hits (活性化合物)。

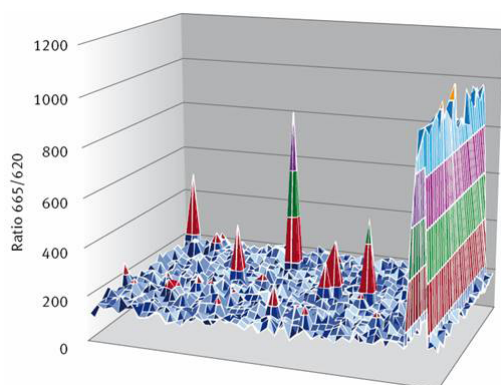


图 5: 用 PHERAstar FS 测得的 IP-One HTRF® 比率

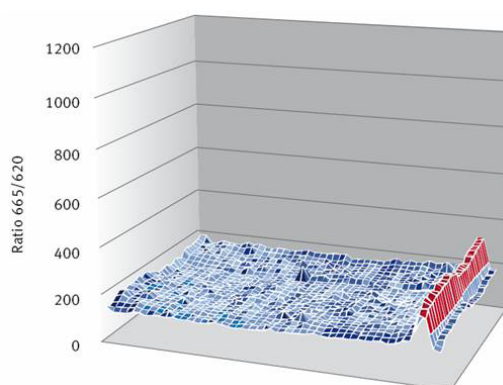


图 6: 用 CCD 微孔板检测仪测得的 IP-One HTRF® 比率

当对比同一块微孔板在两个仪器上读数结果时，很明显只有 **PHERAstar FS** 给出了阳性结果，而 CCD 微孔板检测仪并没有给出明显的尖峰。

	PHERAstar FS	CCD微孔板检测仪
读数时间（1536孔微孔板）	53秒	2分12秒
分析窗	6:1	2:1
Delta F%	490	76
Z'值	0.70	0.24

结论:

用现有的处于领导地位的CCD微孔板检测仪不能发现的低亲和力复合物用PMT微孔板检测仪**PHERAstar FS**可以很容易的检测出来。

相关介绍:

HTRF: HTRF®是均相时间分辨荧光技术的简称，HTRF®技术是对 TR-FRET 技术的进一步改良，提供了更高的灵敏度和稳定性，为法国 **Cisbio** 公司的专利技术。**Cisbio Bioassays** 是一家超过 50 年历史的生命科学、医疗诊断和药物研发公司。**Cisbio Bioassays** 公司所销售的基于 HTRF 技术的产品包括：IP1, cAMP, Cellul'erk 以及 Tag-lite™细胞表面受体平台。在众多 HTRF®的检测仪器中，**BMG LABTECH** 的 **PHERAstar FS** 为 **Cisbio** 公司的推荐仪器。

BMG LABTECH: **BMG LABTECH** 是一家超过 20 年历史的德国公司，多功能酶标仪是其唯一专注的产品，其多功能酶标仪以专业、高端而著称于市场，是科研和药物筛选的最佳选择。特别是 **FLUOstar Omega**（荣获“2010 年科学家的选择之**最佳药物筛选**产品”）以及 **PHERAstar FS**（**Cisbio** 公司推荐最佳 HTRF®检测仪器）更是多功能酶标仪领域的骄子。香港伯齐科技有限公司为 **BMG LABTECH** 在中国大陆和香港、澳门的唯一授权代理商。

采用 **Cisbio IP-One** 和 **PHERAstar FS** 相结合所发表的文章:

1. Monitoring Gq-coupled receptor response through inositol phosphate quantification with the IP-One assay
2. Implementation of Cisbio's HTRF® M1 muscarinic receptor related assays on CyBio liquid handling solutions for small and high throughput

3. Quantifying Ligand Bias at Seven-Transmembrane Receptors
4. A High-Throughput Small-Molecule Ligand Screen Targeted to Agonists and Antagonists of the G-Protein-Coupled Receptor GPR54
5. Illuminating the activation mechanisms and allosteric properties of metabotropic glutamate receptors
6. Facilitatory Interplay in α 1a and β 2 Adrenoceptor Function Reveals a Non-Gq Signaling Mode: Implications for Diversification of Intracellular Signal Transduction
7. High-Throughput Identification and Characterization of Novel, Species-selective GPR35 Agonists
9. Selective Orthosteric Free Fatty Acid Receptor 2 (FFA2) Agonists
IDENTIFICATION OF THE STRUCTURAL AND CHEMICAL REQUIREMENTS FOR SELECTIVE ACTIVATION OF FFA2 VERSUS FFA3
10. Slow Receptor Dissociation Kinetics Differentiate Macitentan from Other Endothelin Receptor Antagonists in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells
11. Homogeneous time-resolved fluorescence-based assay to screen for ligands targeting the growth hormone secretagogue receptor type 1a
12. Antagonists of GPR35 display high species ortholog selectivity and varying modes of action
13. Human cytomegalovirus-encoded UL33 and UL78 heteromerize with host CCR5 and CXCR4 impairing their HIV coreceptor activity
14. Selectively Engaging β -Arrestins at the Angiotensin II Type 1 Receptor Reduces Blood Pressure and Increases Cardiac Performance
15. Inactivation of the Constitutively Active Ghrelin Receptor Attenuates Limbic Seizure Activity in Rodents
16. Identification and Profiling of Novel α 1A-Adrenoceptor-CXC Chemokine Receptor 2 Heteromer*
17. A Selective Luminescent Probe for the Direct Time-Gated Detection of Adenosine Triphosphate
18. Etablierung von Frozen Instant Assays mit kryokonservierten Zellen in 384-Well-Platten für Hochdurchsatzscreenings