

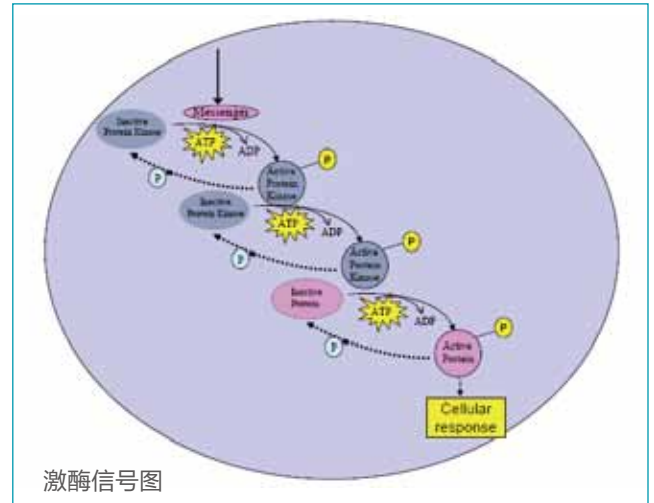
一、激酶筛选方案

激酶药物筛选简介

十年前当人类基因组刚刚发布的时候，在成千上万的蛋白库中理论预测可能为激酶的蛋白大概500种以上。在已公认的药物靶点中，蛋白激酶已成为药物筛选领域中第二大类药物筛选靶点。

激酶包括蛋白激酶、磷酸酶和磷酸二酯酶。蛋白激酶是通过共价调节的方式将磷酸基团转移到其他蛋白上发挥功能的，它们是激酶药筛靶点分子中的最大一类。蛋白激酶表达和功能失调会导致癌症和其他疾病。蛋白磷酸酶和磷酸二酯酶则是信号转导通路中的关键调控因子，在癌症、神经退化、糖尿病和其他疾病中发挥关键作用。

传统研究激酶、磷酸酶和磷酸二酯酶活性的实验方法有两种：一是通过放射性同位素标记，另一种是高特异性的抗体标记；前者存在安全和废弃处理的问题，而后者则有昂贵和费时的问题。



Molecular Devices为激酶提供的解决方案

为了解决这些现存问题，Molecular Devices推出了专利的IMAP®技术，一种基于磷酸基团检测的非放射性和均相分析方法。IMAP技术不是基于特异抗体的技术，而是一种通用技术平台，可应用于任何激酶、磷酸酶和磷酸二酯酶的检测。

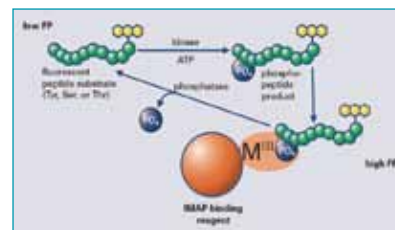
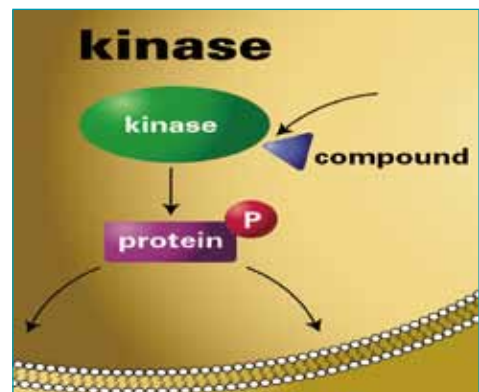
酶反应混合体系是由以下两个组分组成：

- 1) 荧光标记的底物+酶+反应buffer；
- 2) IMAP结合体系，特异结合磷酸化的底物，并终止酶反应。

底物与IMAP珠子的结合作用可以由荧光偏振(FP)和时间分辨荧光共振(TR-FRET)来检测。

IMAP提供了一个应用于激酶、磷酸酶和磷酸二酯酶筛选的完整的实验体系，也成为了准确分析激酶、磷酸酶和磷酸二酯酶的通用平台技术。

另外，为了帮助研究者来选择合适的激酶底物，Molecular Devices还开发了IMAP Substrate Finder Kits可以快速准确地384微孔板中检测一种或几种激酶相对于多种多肽底物的活性。

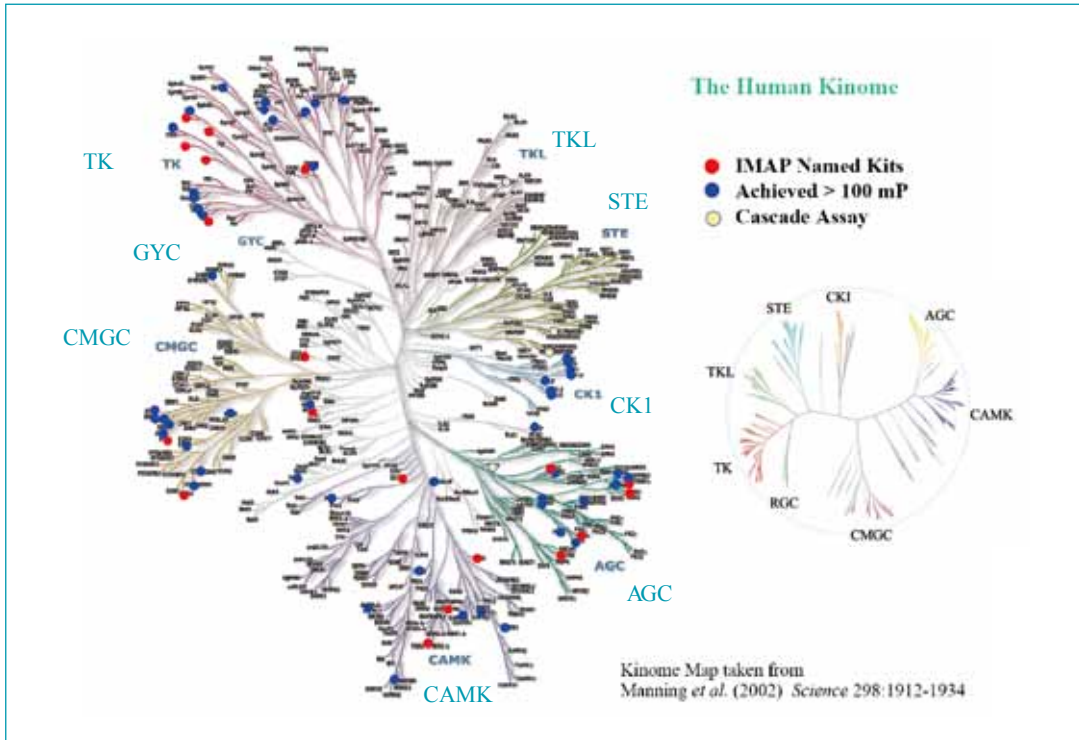


IMAP® Technology



IMAP Reagent Kits

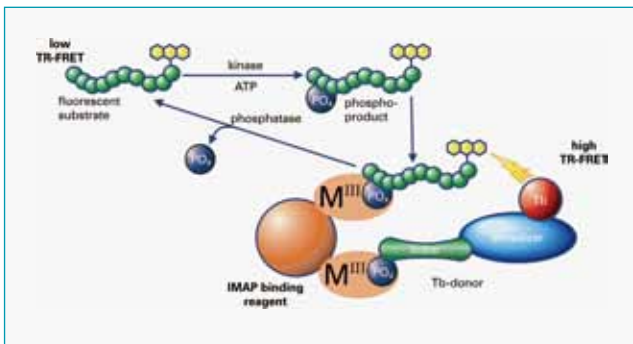
目前，IMAP技术已经应用到的激酶分布图



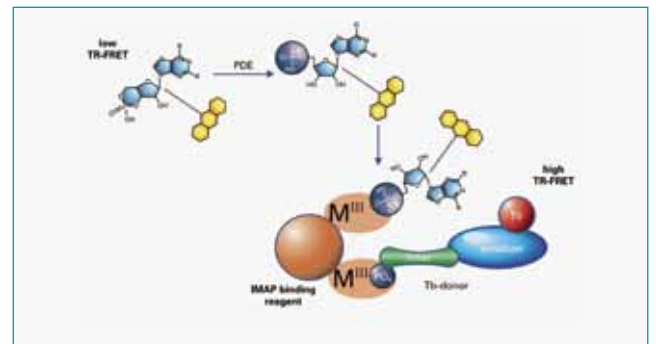
IMAP 技术原理:时间分辨荧光共振能量转移(TR-FRET)和荧光偏振(FP)

1. IMAP TR-FRET检测法

激酶与荧光标记的多肽或蛋白底物反应后，加入亲和溶液，在此体系中，纳米粒子珠会再共价连接上一个铽元素标记的供体分子(Tb)-Donor；当磷酸化的底物多肽或蛋白分子结合到这个纳米粒子上，磷酸化的底物小分子就会与粒子珠上的铽元素标记分子(Tb)-Donor靠近，因而就会在(Tb)-Donor和磷酸化底物小分子间产生TR-FRET效应，通过检测这个效应来检测酶活性。



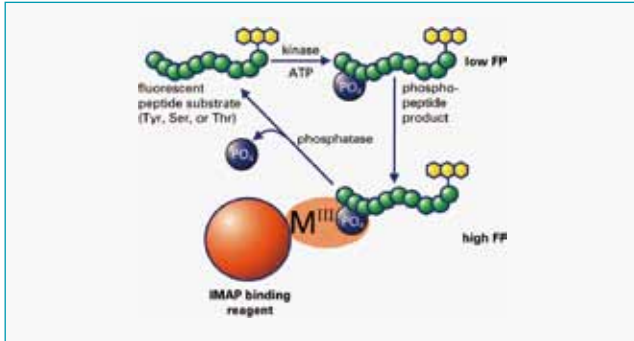
蛋白酶和磷酸酶



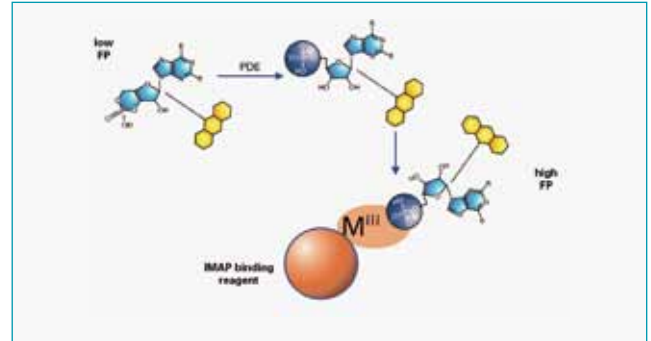
磷酸二酯酶

2. IMAP FP检测法

在激酶与荧光标记多肽底物反应后，加入亲和溶液，磷酸化的小分子多肽底物就会结合到大分子的三价金属离子的纳米珠子上，从而降低了小分子底物分子的自旋速度，因而也就增加了其偏振化程度。



激酶和磷酸酶

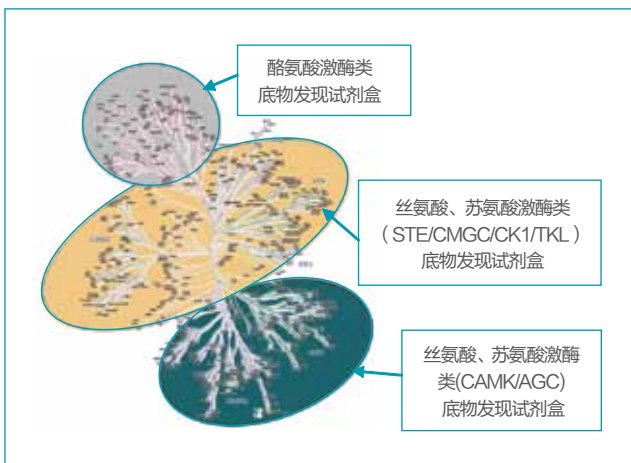


磷酸二酯酶

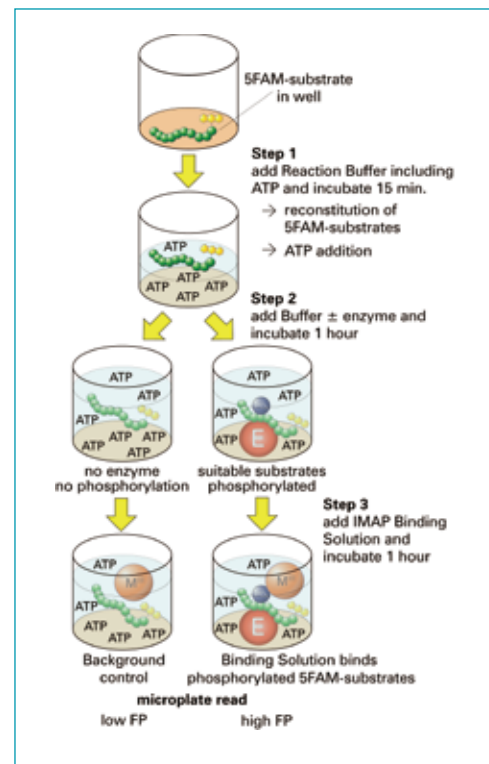
3. IMAP Substrate Finder

在一块384孔板上包含50种以上已经经过验证的多肽底物 (Substrate), 每一底物至少有四个重复, 方便客户用于筛选不同的参数。试剂盒附有Substrate Map, 方便客户分析核对数据。

为了简化实验设计、实验分析和达到最佳实验效果, MD已将 IMAP Assay Kits在FlexStation®3和SpectraMax®M4/M5/M5e, Paradigm系统, 以及FilterMax F3, F5上进行了优化, 此试剂盒有大体积装适用于高通量筛选和小体积装适用于低通量应用。



IMAP® Assays仪器兼容性

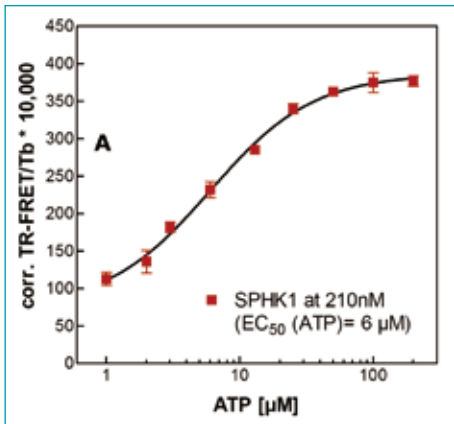


IMAP Substrate Finder实验流程

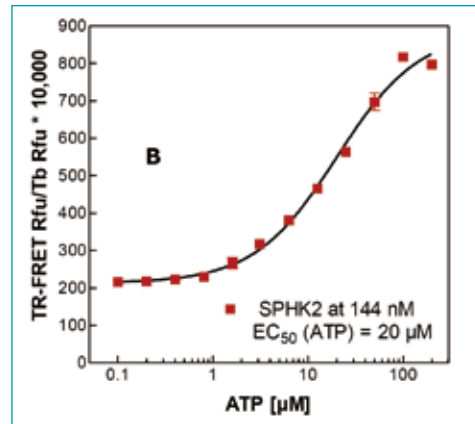
应用实例

1. 鞘氨醇脂肪酸激酶的IMAP® (TR-FRET)筛选平台研究

鞘氨醇脂肪酸激酶实验分析不仅是采用IMAP TR-FRET第一类激酶家族，也建立了一个非常重要的高通量药物筛选靶位。

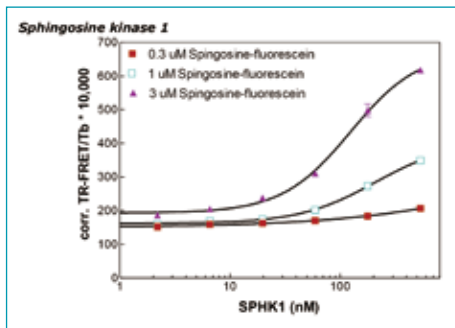


三种底物鞘氨醇水平-鞘氨醇激酶1浓度变化曲线

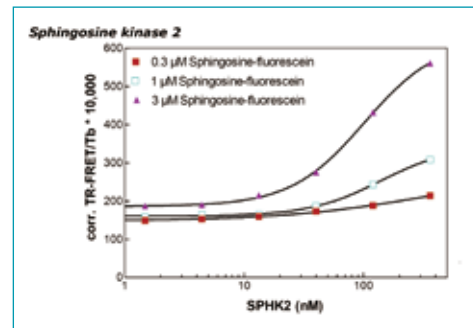


三种底物鞘氨醇水平-鞘氨醇激酶2浓度变化曲线

鞘氨醇激酶1和2 - ATP 的依赖



三种底物鞘氨醇水平-鞘氨醇激酶1浓度变化曲线

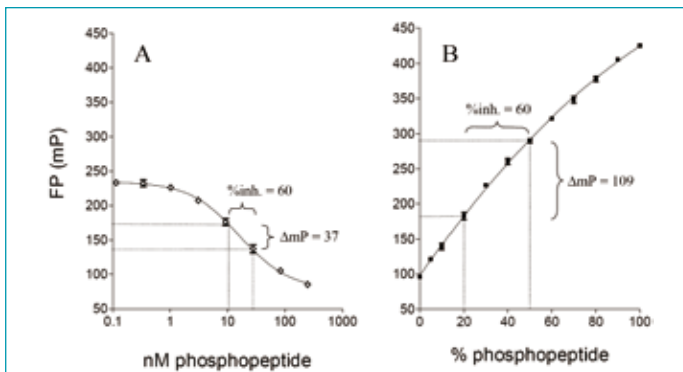


三种底物鞘氨醇水平-鞘氨醇激酶2浓度变化曲线

鞘氨醇脂肪酸激酶的IMAP® (TR-FRET)筛选平台实验总结:

- 低背景
- 不需抗体
- 低化合物干
- 通用平台
- 底物浓度灵活
- 比率计算
- 高灵敏度
- 高通量兼容

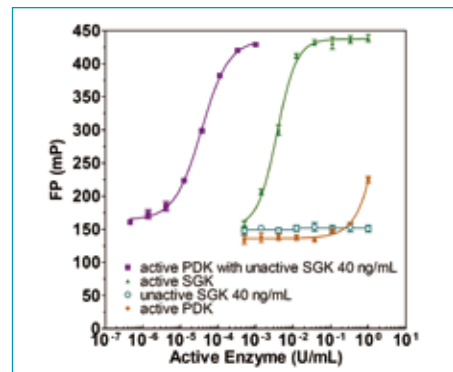
2. 蛋白激酶的IMAP® (FP)筛选平台研究



Syk络氨酸激酶的IMAP-FP分析与免疫

荧光偏振(FPIA)分析对比, 两图中:

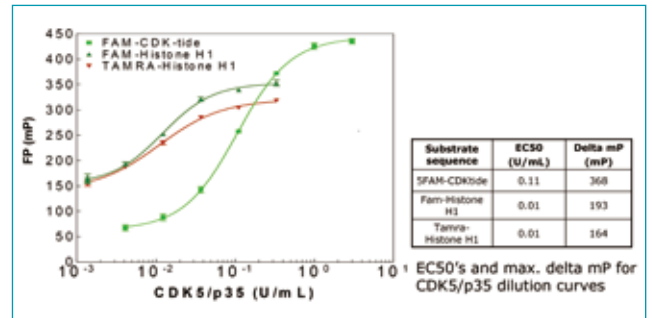
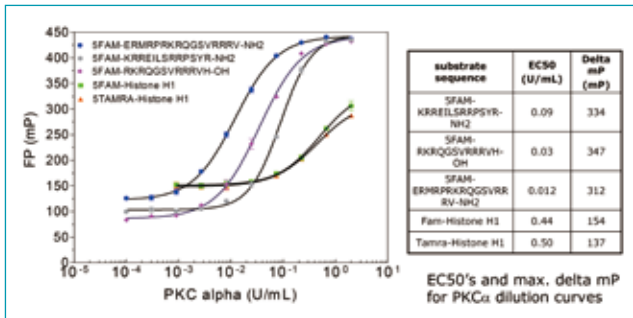
60%激酶抑制: S/N值A<B; Z' 因子A<B EC50: A>B



底物-3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶1(PDK1)浓度效应曲线, 四种体系:

- 1) 活性 PDK + 失活SGK 底物
- 2) 仅活性SGK 底物
- 3) 仅失活SGK 底物
- 4) 仅活性 PDK

3. 蛋白激酶PKC α 和CDK5/p35针对不同底物的稀释效应曲线研究



蛋白激酶的IMAP[®] (FP) 筛选平台实验总结

- 可广泛应用于各种激酶的药物筛选 (多样的底物选择和 < 1 μ M 及 >300 μ M 的ATP浓度范围)
- 与免疫荧光偏振相比较具有更大的信号检测范围
- 可作为激酶级联效应研究, 使得处于非活性状态下的激酶抑制物鉴定成为可能
- 荧光标记的蛋白可作为激酶底物

二、膜转运体筛选方案

神经递质转运体和脂肪酸转运体简介

神经递质转运体的功能失调是神经抑制和退行性疾病，如Alzheimer和Parkinson形成的重要原因。监控5-羟色氨，去甲肾上腺素，多巴胺等神经递质的再摄取过程对进一步理解这些疾病起关键作用。

脂肪酸在多个细胞生物学过程中都发挥重要作用，如线粒体的氧化过程，生物膜的合成过程和能量的储存过程等。细胞内脂肪酸的浓度病理性增加，将导致一系列的疾病，如细

胞凋亡，胰岛素受体脱敏，2型糖尿病，肥胖和心血管疾病等。因此理解脂肪酸的摄取和调控过程将对生物医学的研究和药物的开发有着重大意义。

常规筛选神经递质转运体和脂肪酸转运体的方法都是同位素标记法和复杂的荧光标记法，这些方法或需要通量较低的荧光激活的细胞分选过程，或需要洗涤，损伤细胞。

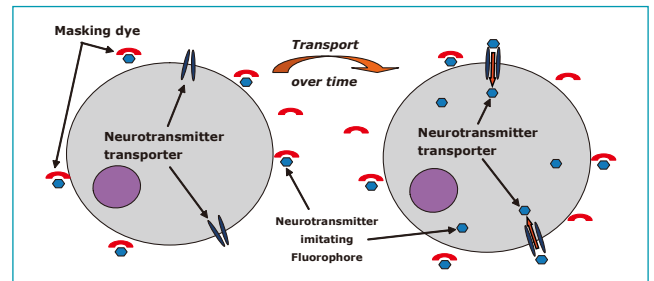
Molecular Devices为膜转运体提供的解决方案

Molecular Devices为膜转运体的制药领域的研究者提供了两类试剂盒：神经递质摄取转运体试剂盒和QBT™脂肪酸摄取转运体试剂盒。两类试剂盒都是同源、免洗、用于活细胞荧光检测的，可扩展到高通量筛选。

一. 神经递质转运体试剂盒

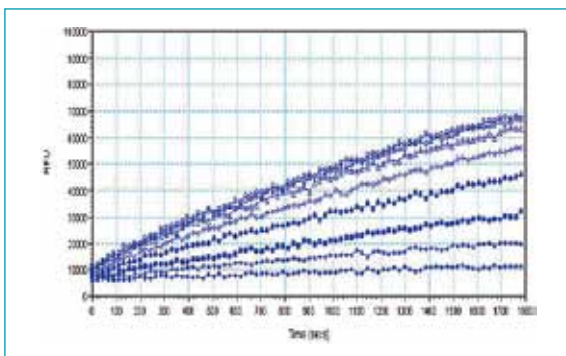
原理

该试剂盒使用一个Mask dye和一荧光物质，其中荧光物质的特性与神经递质5-羟色氨，去甲肾上腺素，多巴胺等相似，可以被相应的转运体摄取入细胞内。细胞外荧光物质的荧光信号被Mask dye掩盖，Mask dye无法进入细胞内，因此细胞内的荧光物质的信号就会释放出来。荧光信号变化可被具荧光功能的酶标仪，如SpectraMax, FilterMax, Paradigm, 以及FLIPR检测。



应用实例

Nisoxetine抑制表达在HEK细胞上的5-羟色氨转运体

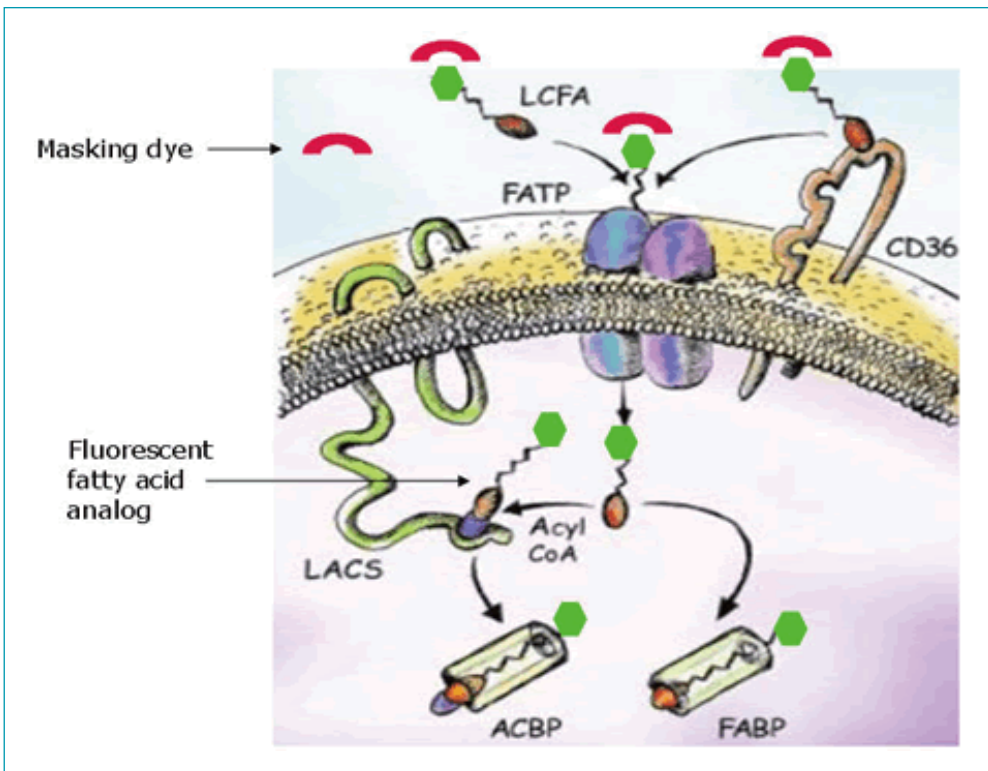


稳定表达人5-羟色氨转运体的HEK细胞以每孔10,000的细胞密度种植在多聚赖氨酸包被的384孔板上过夜。实验前移去培养基，将Nisoxetine溶于含0.1%BSA的HBSS中，37°C下孵育细胞10分钟。然后加入染料。使用FlexStation® 3检测荧光信号的实时变化。

二. 脂肪酸转运体试剂盒

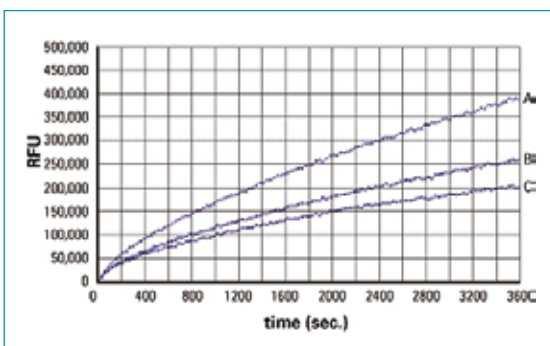
原理

QBT脂肪酸摄取试剂盒使用了一种荧光标记的脂肪酸类似物，该物质可被脂肪酸转运体摄取入细胞内，导致细胞内荧光信号增高。该试剂盒也同样含有Mask Dye，掩盖细胞外的荧光信号。细胞内荧光信号的变化可用酶标仪的底读方式实时检测。相对于对照而言，脂肪酸转运体的抑制剂会降低细胞内荧光信号的强度。



应用实例

Leptin的抑制效应



3T3L1脂肪细胞以50,000个/孔的密度种植于96孔板中，培养基为DMEM+FBS，培养5个小时，然后除去血清，在100 nM leptin存在或不存在的情况下继续培养1小时。加入10 nM Insulin，37°C，5% CO₂下再培养30分钟。最后加入100μl脂肪酸染料。FlexStation[®]3用于检测细胞内荧光信号的实时变化。图中：A：insulin，B：insulin and leptin，C：basal。