APPLICATION NOTE

使用 SpectraMax Paradigm 多功能微孔板检测平台进行 AlphaLISA Screen

前言

炎症是机体对感染、刺激或其它伤害的反应，同时伴随着内皮细胞趋化因子的产生和粘附分子的表达，可导致大量中性白细胞浸润。新的抗炎症药物的发现可以对这些因子起到负调节作用、减轻组织损伤，提高的疗效。筛选这些治疗药物需要一种快速和灵敏的细胞因子定量检测平台。

Molecular Devices SpectraMax Paradigm® 多功能微孔板检测平台是一个用户可升级的微孔板读板机，用户可在 2 分钟内完成功能升级。只要用户想要升级其检测功能，Alpha 技术可以在任何时候加入系统中。

The SpectraMax Paradigm 平台用于快速定量细胞因子 TNF-alpha，可高灵敏的筛选由蓝细菌产生 TNF-alpha 刺激的人类内皮细胞中的抗炎症代谢物。AlphaLISA® 是一种基于微珠的均相实验，以微孔板为载体研究分子间相互作用，可用于细胞因子定量和抗炎症蓝细菌部分的筛选，发掘新的治疗方法。与传统的 ELISA 方法相比，AlphaLISA 可减少由于洗涤过程造成的细胞层损伤，得到更小的标准差和更准确的结果。

TNF-alpha 纯化和定量

第一步是获得纯化的 TNF-alpha 蛋白，可用于内皮细胞中炎症反应刺激测定。为了达到这个目的，人类细胞因子 TNF-alpha 表达于毕赤酵母中，可生产大量重组蛋白，这些蛋白不会产生干扰细胞测定的内毒素。

每升酵母培养物可纯化 10-20 mg 生物活性蛋白。The SpectraMax Paradigm 平台通过使用 AlphaLISA 实验方法 (图 1) 检测蛋白含量可低至皮摩尔水平。软件提供预设实验模板，包含优化过的读板机设置，能在仅仅两分钟内读完 384 孔微孔板。

优势

- 用户可自行配置的微孔板检测平台
- 优异的速度和灵敏度
- 预设实验模板让您更快获得结果

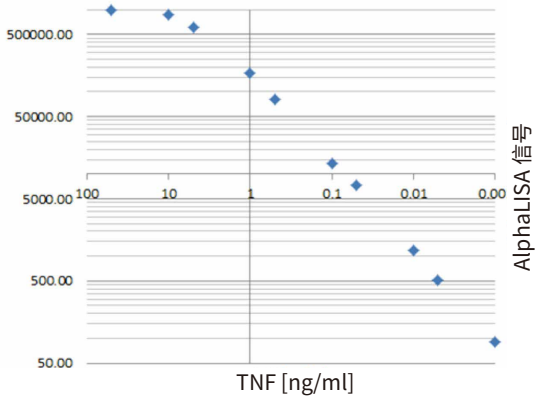


图 1 TNF 标准曲线。在 SpectraMax Paradigm 平台上进行 TNF-alpha 定量可低至皮摩尔水平。检测窗范围达 4 个数量级。

促炎症因子检测

接下来，利用 AlphaLISA 实验来检测内皮细胞应答 TNF-alpha 刺激所产生的促炎症因子水平。人类肺微管内皮细胞 (HLMVEC) 经过上述纯化的人重组 TNF-alpha 刺激后，以诱导细胞间粘附分子 1 (ICAM-1) 的表达。TNF-alpha 孵育 18h 后，ICAM-1 表达上调。ICAM-1 表达水平利用 AlphaLISA 进行定量 (图 2A) 。

内皮细胞被 TNF-alpha 或 LPS 刺激后分泌 IL-8，一种潜在的中性白细胞化学诱导剂，它可渗入体内炎症组织。来源于内皮细胞分泌的 IL-8 的定量能够提供很多关于体外血管内皮细胞的促炎症状态方面的有用信息。使用 AlphaLISA 可对经刺激后的 HL-MVEC 细胞培养上清液进行 IL-8 分泌水平评价 (图 2B) 。

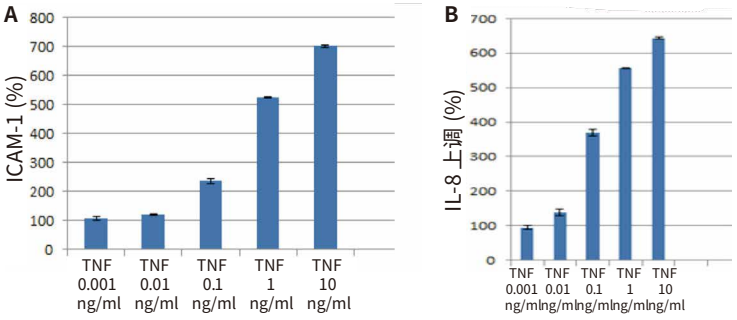


图 2 ICAM-1 和 IL-8 在 HL-MVEC 中上调。TNF–alpha 刺激 18h 后，使用 AlphaLISA 在 SpectraMax Paradigm 平台上检测 HL-MVEC 中的上调的 ICAM-1(A) 和 IL-8(B)。

一种基于内皮细胞筛选的抗炎症化合物识别方法

蓝细菌也被称作蓝绿水藻，拥有显著的代谢多样化，它们中的有些如今已经有望作为治疗化合物且用于测试治疗炎症疾病。以上描述的方法用于筛选来源于蓝细菌的抗炎症化合物。用从蓝细菌中分离出的不同成分预处理 HL-MVEC，然后再用 0.4 ng 人类 TNF-alpha 进行刺激。18 小时后，用 AlphaLISA 技术在 SpectraMax Paradigm 平台上检测出 ICAM-1 水平上调，并进一步分析分泌在细胞培养上清液中的IL-8。蓝细菌成分 8721,6 (图 3) 展示出 ICAM-1 的显著减少，表明了它的抗炎症活性。

这一成分同样展示出 IL-8 分泌明显降低(数据未展示)。此成分在进行 AlphaLISA 前已测试过细胞毒性，结果表明对健康细胞无害。

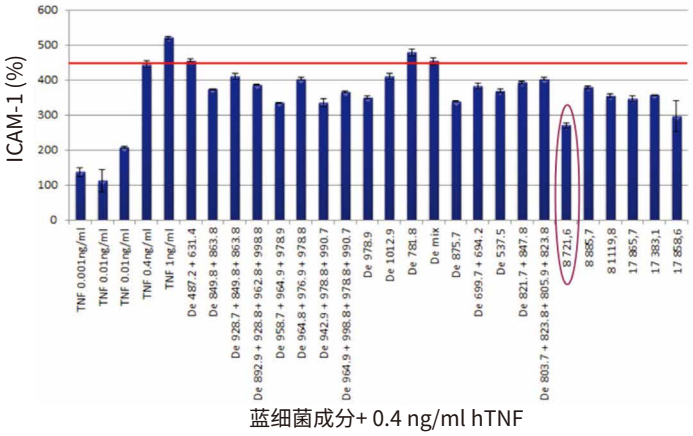


图 3 抗炎症蓝细菌成分的筛选。使用 AlphaLISA 对 TNF-alpha 刺激的 HL-MVEC 中诱导 ICAM-1 上调的蓝细菌成分进行分析。成分 8721,6 可明显减少 ICAM-1 的产生。

结论

SpectraMax Paradigm 平台结合 AlphaLISA 提供了一个强有力的筛选工具，可在基于病理学相关的内皮细胞模型中发现新的治疗方案。高达 1536 孔微孔板检测能力的灵敏度和速度，再结合预先优化了的软件方案，让使用者可以进行更快更高效的检测，SpectraMax Paradigm 平台将成为您使用 Alpha 技术筛选的更好选择。

感谢

我们诚挚的感谢 IMC 应用科学学院的 Maren Plüger, AnitaEigner, Maria Hirschler, Linda Kotnik, Katrin Fuchslueger, Julia Schweiger, Christoph Wiesner,Andreas Eger, Wolfgang Schütt, 和 Harald Hundsberger, Krems, Austria, 以及捷克科学院的 Jiri Kopecky，为我们慷慨提供这里的实验数据。

参考文献

1. Rasool, M.; Sabina, E. P.; Lavanya, B. **Biol Pharm Bull** 2006,29(12), 2483.
2. Romay, C.; Armesto, J.; Remirez, D.; Gonzalez, R.; Ledon, N.; Garcia, I. **Inflamm Res** 1998, 47(1), 36.[31]
3. Prinsep, M. R.; Thomson, R. A.; West, M. L.; Wylie, B. L. **J Nat Prod** 1996, 59(8), 786.

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　www.MolecularDevices.com.cn　Email: info.china@moldev.com

上海　电话: 86-21-3372 1088　传真: 86-21-3372 1066　地址: 上海市长宁区福泉北路 518 号 1 座 501 室　200335
北京　电话: 86-10-6410 8669　传真: 86-10-6410 8601　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
成都　电话: 86-28-6558 8820　传真: 86-28-6558 8831　地址: 成都市锦江区东御街 18 号百扬大厦 2208 室　610016
台北　电话: 886-2-2656 7585　传真: 886-2-2894 8267　地址: 台北市内湖区堤顶大道二段 89 号 3 楼
香港　传真: 852-2289 5385　地址: 香港中环皇后大道中15号置地广场 公爵大厦21楼