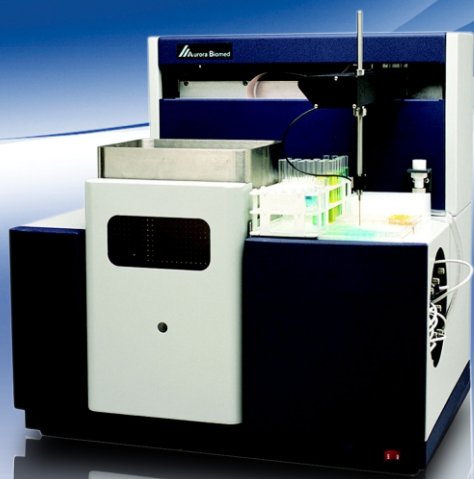


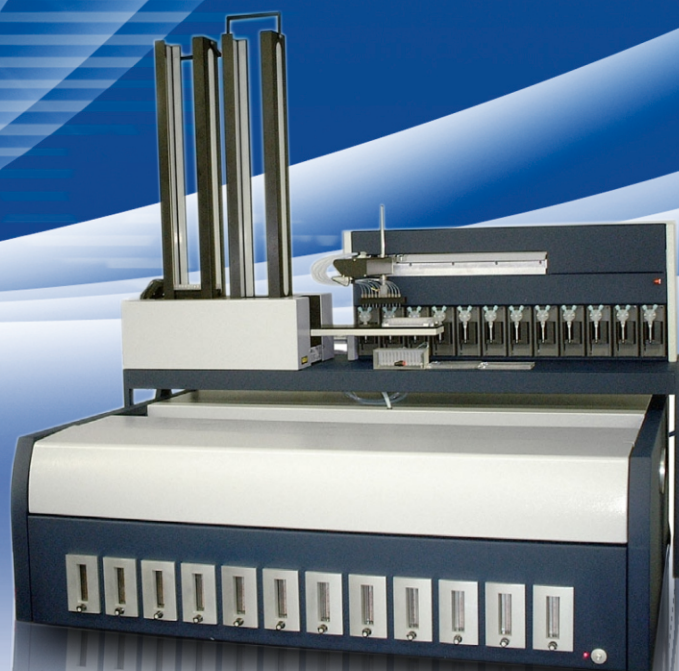


离子通道阅读器(ICR)

Ion Channel Reader Series



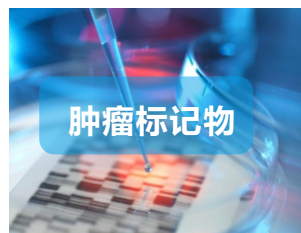
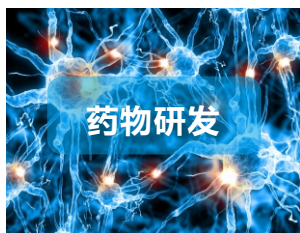
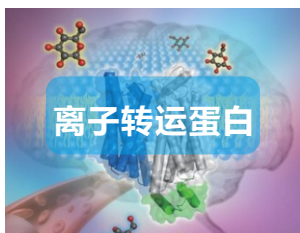
ICR 8000



ICR 12000

突破离子通道与离子转运蛋白研究瓶颈

Eliminating Bottlenecks in Ion Channel & Ion Transporter Research



离子通道阅读器(ICR)

Aurora公司独有的离子通道阅读器系列(Ion Channel Reader, 简称ICR), 通过精准检测细胞内离子流运动情况, 结合本身专利微量分析以及检测技术, 达到对离子通道与离子转运蛋白活性分析以及筛选需要。

ICR能对进出细胞的目标离子流进行精准定量, 通过检测细胞内(外)的目标离子浓度, 从而得出目标离子通道与转运蛋白的活性分析。本方法适用于电压门控和配体门控型离子通道研究, 以及离子泵、共转运体等离子转运蛋白研究, 甚至是传统膜片钳技术难以研究的电中性离子转运蛋白。所以ICR技术可作为传统膜片钳额外的补偿研究手段, 帮助研究学者加速离子通道与转运蛋白靶点相关疾病研究, 以及治疗与预防药物的开发。

另外, ICR方法已被实验验证与多种离子通道研究方法数据吻合, 能很好地反映药物对离子通道和转运蛋白作用效果, 可作为高校研究机构的基础研究之用, 也可以作为相应靶点药物研发的初级和二级筛选, 以及药物安全性评价筛选用途。

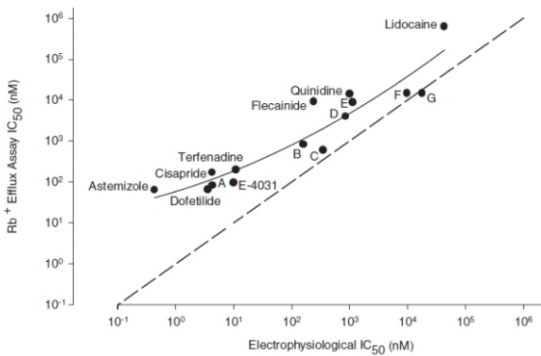
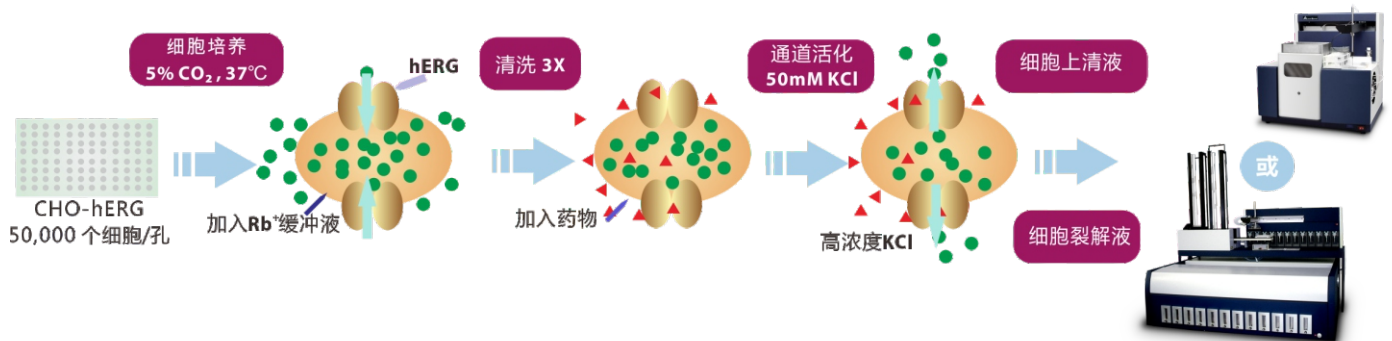


图1. 实验比较了15种化合物利用ICR方法 (Rb⁺流析出分析) 与手动膜片钳方法得出的IC₅₀数值。实验结果得出两种方法数据一致, 线性相关系数R²为0.83 (实线所示), 证明了ICR方法的可靠性。

表1. ICR方法与放射性标记Rb检测方法得出的药效排序一致

| 测试化合物 | ICR 8000™ IC 50 (μM) | ICR 12000™ IC 50 (μM) | ⁸⁶ Rb IC 50(μM) | 3种分析方法得出一致的药效排序 |
|------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------------|-----------------|
| 4636277 | 0.72 | 0.89 | 0.3 | 1 |
| Bumetanide | 1.16 | 1.17 | 1.5 | 2 |
| 993437 | 1.76 | 1.60 | 5.9 | 3 |
| 4653400 | 4.18 | 5.16 | 12.0 | 4 |

ICR方法原理——离子流分析 (Ion Flux Assay)



ICR方法主要是利用示踪离子进出细胞情况进行分析(Ion Flux)。实验设计可针对不同的离子通道和转运蛋白家族，选择恰当的示踪离子，具体可根据情况进行优化。以钾离子通道研究为例，通常使用与钾离子大小、电荷以及渗透性相似的铷离子(Rubidium)作为示踪离子。首先在培养好的细胞中加入高浓度的Rb⁺缓冲液，合适条件下培养一段时间令Rb⁺充分进入到细胞内。然后洗涤缓冲液清洗细胞，以除去细胞外富余的Rb⁺。随后把需要研究的化合物按所需要浓度，与洗涤缓冲液一起加入细胞共孵育。最后打开离子通道，让细胞内的Rb⁺析出。对于电压门控型离子通道，可以通过加入去极化的缓冲液迫使离子通道打开，而配体门控型离子通道则需要相应的配体来打开。实验最后分别收集细胞外液和细胞裂解液，通过ICR检测Rb⁺浓度，将细胞外液Rb⁺浓度与总Rb⁺浓度（细胞外液加上细胞裂解液）作比值，得出Rb⁺流出效率，根据不同实验组浓度拟合IC₅₀曲线，从而得到研究化合物对离子通道的影响效果。由于最后采用比值方法，可以消除孔之间的细胞密度以及Rb⁺加载效率的差异。

ICR方法得出的量效曲线

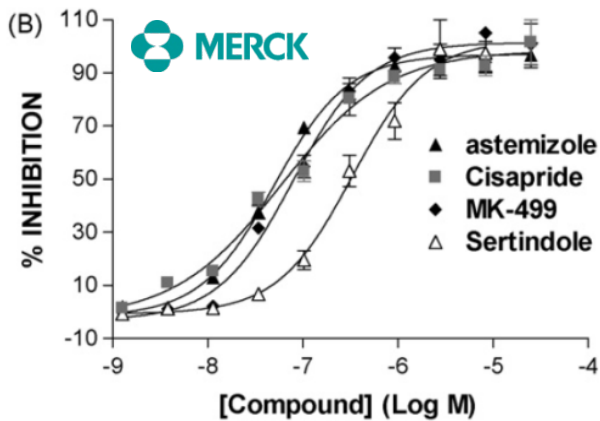


图2. 针对hERG钾通道的Rb⁺流分析

实验通过构建稳定表达hERG的CHO细胞株，研究不同浓度的hERG拮抗剂Astemizole, Cisapride, MK-499以及Sertindole的抑制效果。

图3. 针对Nav1.7钠通道的Li⁺流分析

实验通过构建稳定表达Nav1.7的HEK293细胞株，研究不同浓度的TTX(▼), Tetracaine (●), 以及Lidocaine (■) 对于Nav1.7的抑制效果。

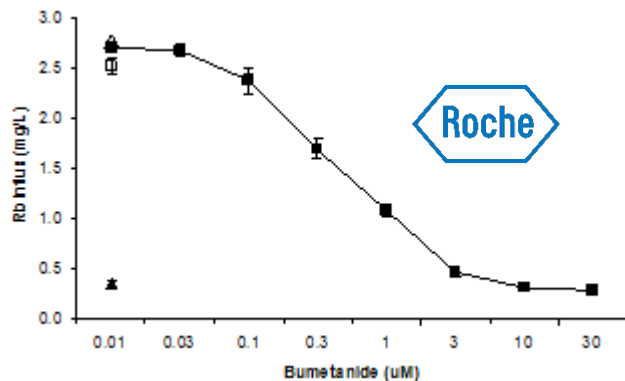
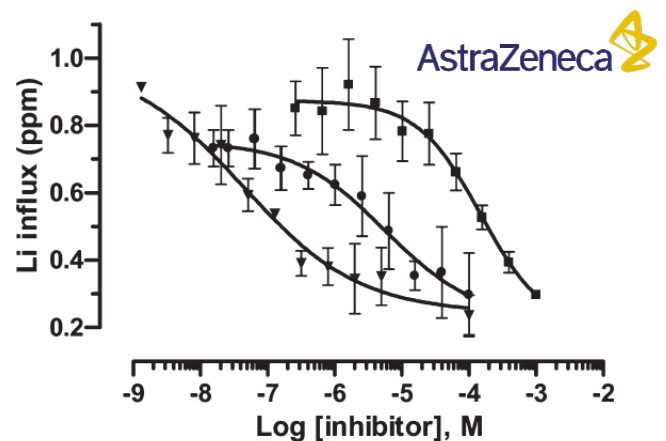


图4. 针对NKCC1共转运蛋白的Rb⁺流分析

研究不同剂量的Bumetanide对于NKCC1的Rb⁺流抑制的反应曲线，药物反应时间为2分钟(■)。阳性对照组为细胞加入30µM Bumetanide(▲)，阴性对照分别为加入1µM Digoxin (□)以及不加入任何药物(△)。



适用于离子通道与转运蛋白研究

利用非放射性标记Rb⁺流分析方法作为研究工具，筛选膜通道蛋白调节剂已被众多科学文献验证，并被广泛应用于研究钾离子通道。在得到与放射性标记Rb⁺方法同样的信息含量以及精确结果的同时，能避免受到短半衰期以及暴露于放射性物质的影响。Rb(铷)因其离子大小、电荷以及渗透性等与钾离子类似，而且在天然生物体内并未发现，是最常用研究钾通道的示踪离子。这种非放射性标记的示踪离子流研究方法，可以根据需要扩展至其他膜通道蛋白类型研究。

| 示踪离子 | 研究类型 |
|------------------------------------|--|
| Rb ⁺ | 钾离子通道及转运蛋白: <i>hERG, KCNQ2, Kv1.1, Kv1.3, Kv1.4, Kv1.5, Kir6.2, B/SKCa, Slack, K_{ATP}, NKCC1, Na⁺, K⁺, -ATPase</i> 等等 |
| Ag ⁺ | 氯离子通道及转运蛋白: <i>KCC2, TMEM16A, CFTR</i> 等等 |
| Li ⁺ | 钠离子通道: <i>Nav1.2, Nav1.5, Nav1.7</i> 等等 |
| Ca ²⁺ /Sr ²⁺ | 钙离子通道: 心肌L型通道等等 |

表2. 离子流分析(Ion Flux)方法并不仅仅限于研究钾通道。可以根据研究的膜通道蛋白类型选择其他适合的示踪离子，如Ag⁺, Li⁺, Ca²⁺以及其他离子。

各种膜通道蛋白筛选技术比较

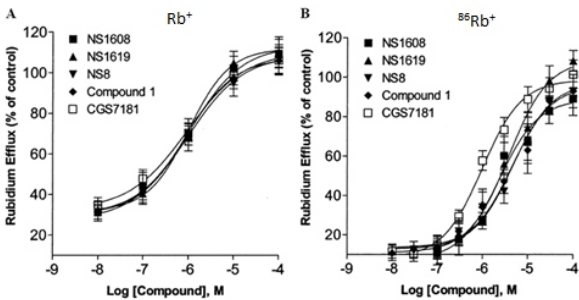
目前已经有几种常见筛选技术研究离子通道活性。对比其他几种研究技术，ICR无论是检测速度、精确度还是结果重现性，都具有不可比拟的优势。

| 方法 | 信息含量 | 处理通量 | 灵敏度 | 精确度 | 评价 |
|-----------|------|------|-----|-----|-----------------------|
| ICR 8000 | 一般 | 一般 | 高 | 一般 | 可应用于钾离子，钠离子，氯离子和钙离子通道 |
| ICR 12000 | 一般 | 一般 | 高 | 一般 | 可应用于钾离子，钠离子，氯离子和钙离子通道 |
| 自动膜片钳 | 高 | 一般 | 高 | 高 | 不适用于电中性目标 |
| 结合实验 | 低 | 高 | 一般 | 低 | 需要放射性同位素标记的特异性探针 |
| 放射性离子流实验 | 一般 | 一般 | 一般 | 一般 | 短的半衰期及暴露于放射性物质风险 |
| 荧光成像 | 低 | 高 | 一般 | 低 | 易于人工染色，高消耗及高背景噪音 |

参考用户以及发表文献

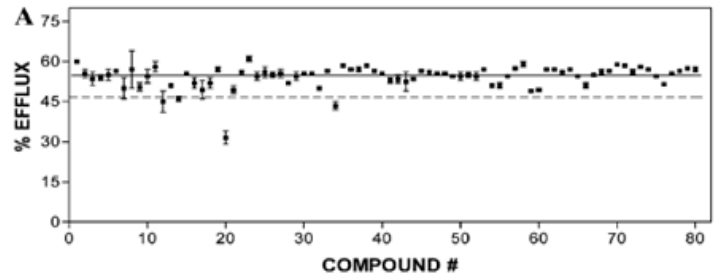
ICR方法通过检测离子进出细胞的情况来反映离子通道和转运蛋白的活性，根据其原理，易于开发不同的离子通道和转运蛋白研究方法。ICR的自动化流程以及高通量筛选，非常适用于药厂研发靶点药物所用，而数据的可靠性以及合理的操作成本，也非常适合学术科研机构的基础研究之用。

大电导钙激活钾离子通道的功能分析



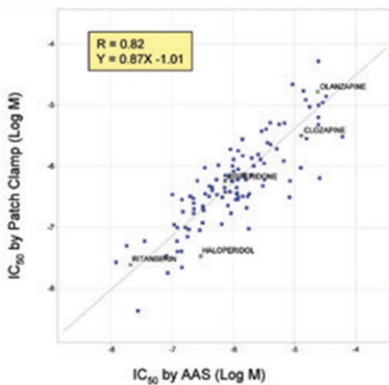
通过ICR方法(图A)以及放射性Rb⁺方法(图B)比较5种化合物对BK(Ca)的药理作用，证明了ICR非放射性Rb⁺方法更适用于新型钾离子通道调节剂的高通量筛选

KCNQ2钾离子通道调节剂筛选



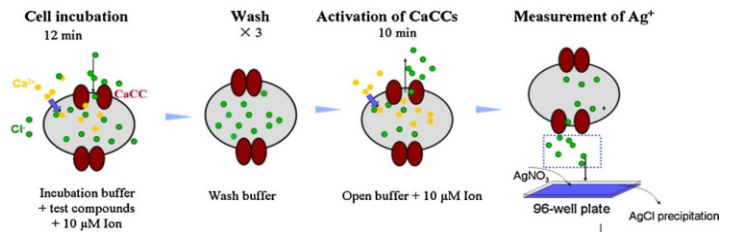
阿斯利康曾就80种化合物对KCNQ2钾离子通道调节作用进行筛选，实线表示所有样品对离子流析出影响的平均值%，虚线则代表药物作用平均值下降20%的临界值。发现共有4种化合物在此临界值之下，为下一步进行的浓度依赖性实验提供依据。

手动膜片钳与ICR方法在hERG钾通道调节剂效能比较



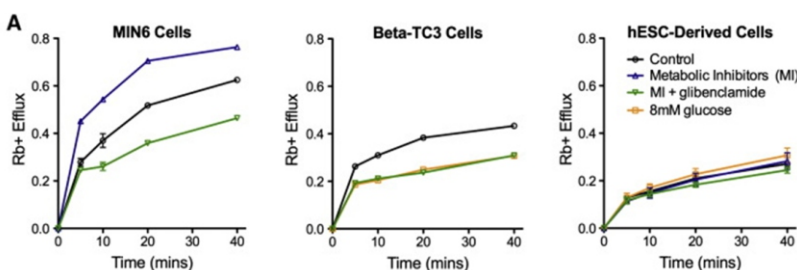
通过对比112种化合物利用手动膜片钳和ICR方法得出的IC₅₀数值对比，相关性系数R²为0.82，高度相关性说明ICR方法是一种可靠精准的测试方法，能如期反应被测药物对于hERG钾通道的效果。

利用Ag⁺作为示踪离子研究Cl⁻通道调节剂



利用ICR构建高通量筛选CaCC调节剂方法。稳定表达TMEM16A-CHO细胞株在药物反应步骤后加入过量Ag⁺得到AgCl沉淀，通过测定游离的Ag⁺间接得到上清液中Cl⁻含量。此方法可以扩展为研究其他类型氯离子通道调节剂。

hESC源干细胞模型中钾离子通道活性测试



ICR方法研究发现，在hESC源干细胞模型中K_{ATP}钾离子通道既不受抑制剂(Glibenclamide和Glucose)影响，也不受激活剂(Oligomycin和2-deoxy-D-glucose)影响，而在MIN6 β细胞株和beta-TC3细胞株可以看到抑制剂对于K_{ATP}的抑制作用。

离子通道与转运蛋白研究新方向

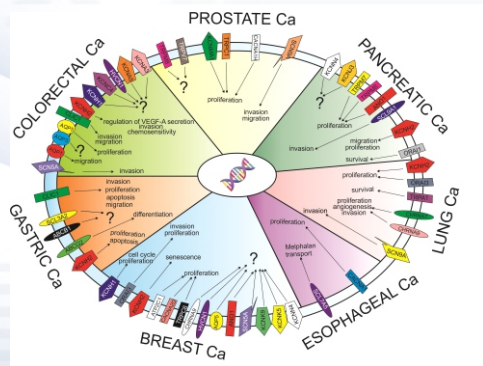
肿瘤诊断与治疗

据佛罗伦萨大学研究发现，离子通道与转运蛋白除了参与肿瘤细胞增殖、分化和凋亡等生理活动，还可一定程度作为肿瘤标记物。例如某些类型离子通道与转运蛋白在肿瘤细胞系表达显著上调，在肿瘤起源的相应正常组织却低表达或不表达。目前在乳癌、前列腺癌、肺癌、直肠癌、食管癌、胰腺癌、胃癌等癌症研究领域上均有类似表现。



天然化合物筛选

随着人类疾病谱的改变，西药抗药性暨药源性疾病的增加，国际上开始盛行回归大自然的潮流。传统的天然化合物，加上有效成分提取以及作用靶点研究等现代科学手段，重新赋予离子通道与转运蛋白研究课题新方向。例如一些天然化合物中具有肽类毒素，经研究发现是通过阻断离子通道，而实现镇痛、麻醉作用。对此类化合物进行修饰，可以达到入药治病的作用。



| 特点 | ICR 8000™ | ICR 12000™ |
|-----------|-----------------|------------------|
| 处理通量 | 高达5000 数据点/天 | 高达60000 数据点/天 |
| 最低进样体积 | 50μL | 20μL |
| 仪器尺寸 (cm) | H67 × W55 × D37 | H120 × W95 × D37 |
| 灵敏度 | 检出限0.05ppm | |
| 精确度 | < 5% CV | |

参考文献

A. S. Groebe, D. R. Scott, V. E. Feng, J. Zhang, X. Warrior, U. ... Shieh, C. (2003). Functional Analysis of Large Conductance Ca²⁺-Activated K Channels: Ion Flux Studies by Atomic Absorption Spectrometry. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 1(5), 647-654. doi:10.1089/154065803770381002

Bruin, J. E., Erenser, S., Vela, J., Hu, X., Johnson, J. D., Kurata, H. T., ... Kieffer, T. J. (2014). Characterization of polyhormonal insulin-producing cells derived in vitro from human embryonic stem cells. *Stem Cell Research*, 12(1), 194-208. doi:10.1016/j.scr.2013.10.003

Karczewski, J., Wang, J., Kane, S. A., Kiss, L., Koblan, K. S., Culbertson, J. C., & Spencer, R. H. (2009). Analogs of MK-499 are differentially affected by a mutation in the S6 domain of the hERG K channel. *Biochemical Pharmacology*, 77(10), 1602-1611. doi:10.1016/j.bcp.2009.02.011

Lastraioli, E., Lottini, T., Bencini, L., Bernini, M., & Arcangeli, A. (2015). HERG1 Potassium Channels: Novel Biomarkers in Human Solid Cancers. *BioMed Research International*, 2015, 1-9. doi:10.1155/2015/896432

Qi, J., Wang, Y., Liu, Y., Zhang, F., Guan, B., & Zhang, H. (2014). Development and validation of HTS assay for screening the calcium-activated chloride channel modulators in TMEM16A stably expressed CHO cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(6), 1713-1721. doi:10.1007/s00216-013-7550-5

Rezazadeh, S. (2004). Rb Flux through hERG Channels Affects the Potency of Channel Blocking Drugs: Correlation with Data Obtained Using a High-Throughput Rb Efflux Assay. *Journal of Biomolecular Screening*, 9(7), 588-597. doi:10.1177/1087057104264798

Scott, C. W., Wilkins, D. E., Trivedi, S., & Crankshaw, D. J. (2003). A medium-throughput functional assay of KCNQ2 potassium channels using rubidium efflux and atomic absorption spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 319(2), 251-257. doi:10.1016/S0003-2697(03)00328-2

Stankovich, L., Wicks, D., Despotovski, S., & Liang, D. (2004). Atomic Absorption Spectroscopy in Ion Channel Screening. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 2(5), 569-574. doi:10.1089/adt.2004.2.569

Terstappen, G. C. (2004). Nonradioactive Rubidium Ion Efflux Assay and Its Applications in Drug Discovery and Development. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 2(5), 553-559. doi:10.1089/adt.2004.2.553

Trivedi, S., Dekermendjian, K., Julien, R., Huang, J., Lund, P., Krupp, J., ... Bostwick, R. (2008). Cellular HTS Assays for Pharmacological Characterization of NaV1.7 Modulators. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 6(2), 167-179. doi:10.1089/adt.2007.090

Wen, Y., Roth, D., Enderle, T., Gill, S., Gill, R., Liang, S., & Liang, D. (2016). Development of Rubidium Flux Assay & HTS Campaign for Modulators of a Cation-Chloride Co-transporter. accessed April 27, 2017, http://www.aurorabiomed.com/wp-content/uploads/2016/11/Development-of-Rubidium-Flux-Assay-HTS-Campaign-for-Modulators-of-a-Cation-Chloride-Co-transporter_YangWen_2016.pdf.



Aurora Biomed Inc./Aurora Instruments Ltd.
 1001 East Pender Street, Vancouver BC V6A 1W2
 Phone: 604-215-8700
 Fax: 604-215-9700
 Email: info@aurorabiomed.com
 Website: www.aurorabiomed.com

亚洲商务技术服务中心
 广东省佛山市顺德区大良德胜东路2号奥罗达科技园
 邮编：52800
 电话：0757-22320298
 传真：0757-22320293
 邮箱：market@aurorabiomed.com.cn
 网址：www.aurorabiomed.com.cn