

FLIPR 高通量实时荧光检测技术特点及其 在 G 蛋白偶联受体和离子通道研究中的应用



目录

FLIPR 系统简介	- 2 -
G 蛋白偶联受体和药物开发	- 3 -
离子通道研究与药物开发	- 5 -
CiPA 与心脏安全药理学评价	- 8 -
FLIPR 系统在 CiPA 项目中的应用.....	- 9 -
FLIPR 在创新药物开发中的应用	- 11 -
FLIPR 高通量实时荧光检测分析技术的主要应用	- 12 -
主要应用方向和技术方法.....	- 12 -
FLIPR 系统检测细胞内钙离子浓度的变化.....	- 13 -
(1) 内源性表达的 M1 受体.....	- 13 -
(2) P2Y 受体的 ATP 激动效应.....	- 14 -
(3) 内源性表达的 M3 受体.....	- 15 -
(4) 内源性表达的 H1 受体.....	- 15 -
(5) 化学发光方法检测细胞内钙离子浓度变化.....	- 16 -
膜电位检测：在 CHO 细胞上测定 KCl 诱导的去极化.....	- 18 -
膜电位检测：Na _v 1.5 通道特性研究.....	- 19 -
钾离子通道：hERG 通道阻断剂特性的分析.....	- 19 -
电压敏感探针：比率检测内向整流钾通道 (Kir) 的变化.....	- 20 -
FLIPR 系统检测细胞内 PH 值变化.....	- 21 -
药物研发早期 EarlyTox™ 心肌毒性检测.....	- 23 -
iCell 心肌细胞钙振荡检测.....	- 23 -
化合物诱导人 iPSC 来源的心肌细胞心律失常的多参数评估.....	- 25 -
神经毒性分析：人 iPSC 来源的神经细胞球 3D.....	- 27 -
FLIPR 其它应用方向.....	- 30 -
(1) 更精确、更低干扰、更好信噪比的比例法钙流检测 (Fura-2).....	- 30 -
(2) Gi 和 Gs 介导的非 Gq 通路 GPCR 功能检测.....	- 30 -
FLIPR 系统的卓越性能	- 31 -
(1) 多种通量的移液加样头.....	- 31 -
(2) 多种波长的激发光源与滤光镜片.....	- 31 -
(3) 全波长应用，满足更多实验需求.....	- 32 -
(4) 系统具有良好的可扩展性：.....	- 33 -
(5) 功能强大、使用方便的软件 ScreenWorks™.....	- 33 -
(6) 配套试剂.....	- 34 -
FLIPR 实时荧光检测分析系统技术参数	- 35 -
近年部分发表文献	- 36 -

FLIPR 系统简介

FLIPR 是美国分子仪器公司推出的高通量 CCD 成像读板机，主要用于生命科学研究和高通量药物筛选，例如分子生物学、植物学、遗传学、动物学、微生物学、病理学与病理生理学等学科研究。

FLIPR 实时荧光检测分析系统采用了多种技术在精度上功能上的特点，为研究提供多种方法、多角度的可靠分析数据；其优越性主要体现在以下几个方面：

第一、FLIPR 是一台将加液系统和检测系统完美整合的仪器，是一台 workstation 工作站和 CCD 成像读板机的组合。无论是 GPCR 钙流的定量研究，还是离子通道效应的检测中，由于反应非常快，所以一方面需要非常快的加液和检测系统，而珍贵的微量样品，同时要求加液系统的准确而不能浪费。FLIPR 可选配 96/384/1536 加液系统和快速的钙流荧光检测系统，整板同时加液，CCD 整板成像，0.47s 成像间隔，高质量的数据，完全满足我们的实验要求。

第二、FLIPR 可选配 LED 和滤光片组合，进行不同波长的荧光检测和化学发光检测。针对不同的检测指标，厂家同时研发了配套使用的试剂盒，确保可以得到高质量的结果。同时可无缝联合机械臂，满足实验设计的完整性并实现实验操作的最大自动化。选配的加样头以及 LED、滤光片，更换起来非常方便，不需要任何工具，实验人员即可操作。

第三、为满足细胞实验的特殊性，FLIPR 还特别设计了一个细胞培养池。可外接液体循环清洗系统，细胞悬液可直接置于细胞培养池，只需在软件内编辑模板，轻点鼠标，即可进行细胞加样。同时，此处还可做实验过程中清洗枪头之用。

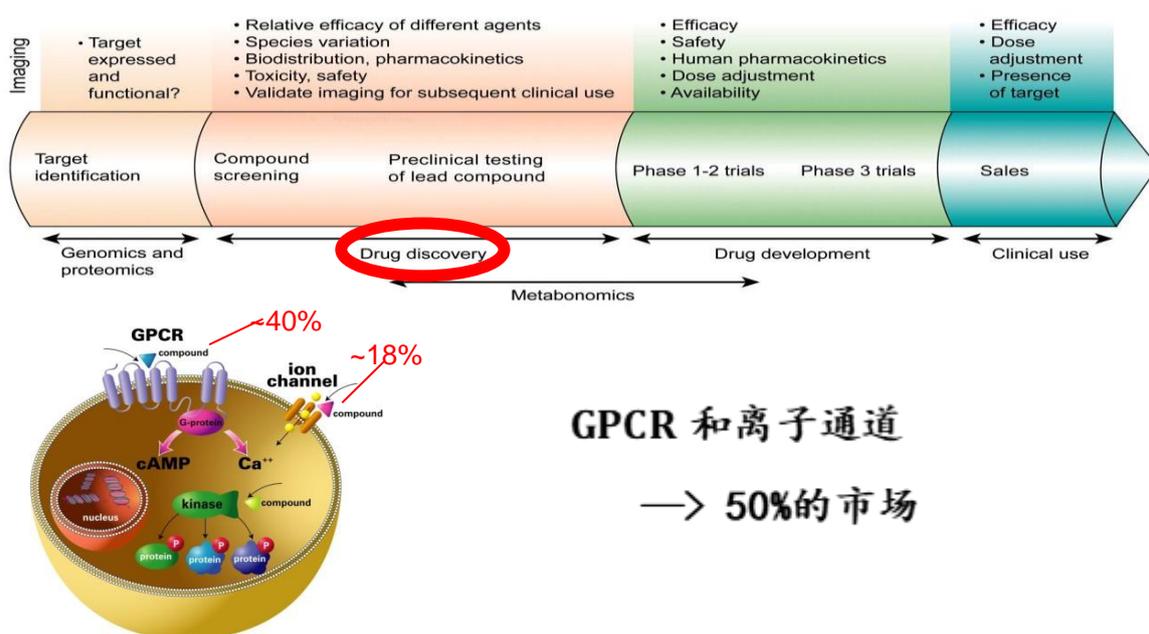
第四、FLIPR 配套的软件 screenwork 功能强大，使用简便。即可得到实时检测的荧光/化学发光结果，也可一步拟合出 EC/IC50 结果。

因此，FLIPR 一台仪器相当于一台 workstation 工作站和一台 CCD 成像读板机的完美结合，是现今用于离子通道和 GPCR 常规研究以及药物开发中不可缺少的仪器。目前，全球 FLIPR 的装机量已超过了 1000 台，市场占有率超过 80%；在国内，部分知名高校、各大制药公司以及 CRO 企业已成为我们 FLIPR 的忠实用户，有些单位甚至拥有一台以上 FLIPR，市场占有率超过 90%。FLIPR 高通量的荧光/化学发光检测方法和高质量的数据已经被生物界广泛接受和认可，成为其采购仪器的首要选择。

G 蛋白偶联受体和药物开发

随着对人类各种疾病分子机制的了解，人们发现了大量的可用于药物筛选的药靶，且数量在不断的增加。新技术的应用，促进了作用于这些药靶的新药开发。人们服用的药物，如：激素、神经肽、化学活性物质、产生味觉的物质(如：香料)等，许多是通过结合到 G-蛋白偶联受体(GPCR)上引发信号传导的。约有 80%的激素、神经递质和神经调节物被认为是通过 G-蛋白偶联受体进行信号传递的。G-蛋白偶联受体是最大的一组药靶，在人类基因组中，大约有 600 个基因编码这个家族的蛋白。在小分子药物的发现过程中，G-蛋白偶联受体也是目前最成功的一类蛋白质药靶。从目前用于治疗的药物及用于药物开发的药靶来看，大约 500 个靶分子已经或正在成为药物开发的对象，其中 G-蛋白偶联受体约占 45%，是最大的一类；离子通道约占 18%。

G 蛋白偶联受体 (GPCR)、离子通道等占据市场半壁江山的药物开发靶点是都具有与化合物结合受信号变化过程迅速的特点，这就决定了检测仪器必须可以实现化合物添加等溶液处理体系与信号检测体系可以同步运行，准确、可靠地真实反应出信号的动力学变化过程。

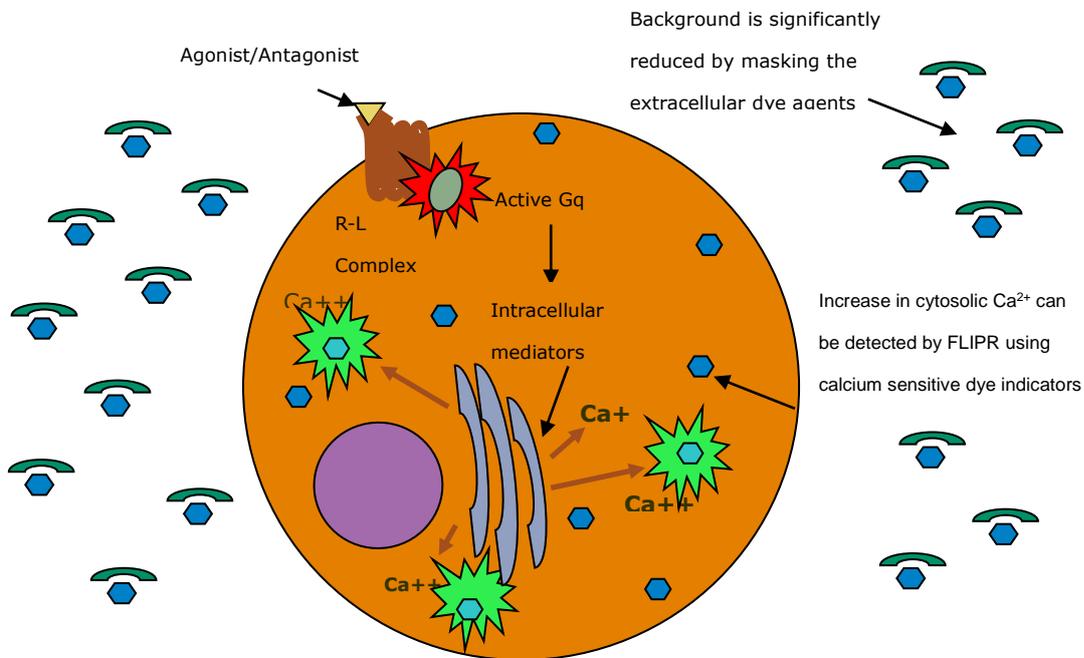


GPCRs 即与 G 蛋白偶联受体，G 蛋白 (GTP 结合蛋白) 包含三个亚基： α 、 β 和 γ ，形成三聚体。当细胞外配体与 GPCRs 结合后，GPCRs 构象改变，激活 G 蛋白，GTP 磷酸化 $G\alpha$ 亚基，导致 $G\alpha$ 亚基从三聚体解离，与 β 和 γ 亚基分离。 $G\alpha$ 亚基进入胞浆进而激活下游效应器 AC (磷脂酶 C) 或 PLC (腺苷酰环化酶) 并产生生物学效应。此外， β 、 γ 亚基也能够激活其他通路，如通过磷脂酶 A2 激活心肌细胞 K^+ 通道，产生生物学效应等。但通常所讲的 G 蛋白一般是指 α 亚基。 $G\alpha$ 的不同亚型 $G_{\alpha s}$ 、 $G_{\alpha i}$ 和 $G_{\alpha q}$ 激活后会产生不同的生物学效应，其中 $G_{\alpha s}$ -偶联受体激活腺苷酰环化酶(AC)导致

cAMP 增加; Gai-偶联受体激活腺苷酰环化酶(AC)导致 cAMP 降低; Gαq 偶联受体激活磷脂酶 C(PLC), 产生 IP₃, IP₃ 能使细胞内 Ca²⁺浓度升高。

细胞水平的 GPCR 受体筛选, 目前公认的最方便、最容易操作、数据最可信的方法是直接实时检测因 GPCR 受体激活诱导的细胞内钙离子浓度变化。GPCR 信号通过 G_q 会使细胞内钙释放, 因此通过钙离子敏感荧光探针检测细胞内钙释放, 即可检测通过 G_q 途径信号转导的 GPCRs。

钙流信号诱导快, 消失也快, 从诱导到消失可在数秒内完成。高通量检测细胞内钙流要求检测仪器具有内置的高通量加样系统、极高的采样频率, 以及实时、加样的同时同步采集数据的能力。MD 公司的 FLIPR 能够配合使用高效高信噪比钙试剂盒: Calcium 4、Calcium 5 和最新推出的 Calcium 6 Assay Kit, FLIPR 以每小时获取 3 万个以上的数据点的通量实现 GPCRs 的高通量筛选。试剂盒的原理如下:



该试剂盒内包含钙离子敏感的荧光指示剂和 masking dye。在细胞外溶液中, 荧光指示剂的荧光信号被 masking dye 所掩盖。在细胞孵育过程中, 细胞膜上的酯酶切除指示剂分子的 AM 部分, 从而使该分子不能再反向通过细胞膜回到细胞外溶液中。Masking dye 不能通过细胞膜, 留在细胞外液中掩盖背景荧光信号。当细胞内钙离子浓度变化时, 钙敏感指示剂的荧光信号将会发生变化。

离子通道研究与药物开发

离子通道(ion channel)是细胞膜上的一类特殊亲水性蛋白质微孔道,是神经、肌肉细胞电活动的物质基础。随着分子生物学、膜片钳技术的发展,人们对离子通道的分子结构及特性有了更加深入的认识,并发现离子通道的功能、结构异常与许多疾病的发生和发展有关。因基因突变或药物作用而导致的离子通道结构改变和功能障碍与一系列疾病的发生和发展有关,被称作离子通道病。近年来,以离子通道为靶点的药物开发也越来越受关注,成为药物筛选的第三大靶点。

离子通道的主要类型

离子通道的开放和关闭,称为门控(gating)。根据门控机制的不同,将离子通道分为三大类:(1)电压门控性(voltage gated),又称电压依赖性(voltage dependent)或电压敏感性(voltage sensitive)离子通道:因膜电位变化而开启和关闭,以最容易通过的离子命名,如 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Cl^- 通道 4 种主要类型,各型又分若干亚型。(2)配体门控性(ligand gated),又称化学门控性(chemical gated)离子通道:由递质与通道蛋白质受体分子上的结合位点结合而开启,以递质受体命名,如乙酰胆碱受体通道、谷氨酸受体通道、门冬氨酸受体通道等。非选择性阳离子通道(non-selective cation channels)系由配体作用于相应受体而开放,同时允许 Na^+ 、 Ca^{2+} 或 K^+ 通过,属于该类。(3)机械门控性(mechanogated),又称机械敏感性(mechanosensitive)离子通道:是一类感受细胞膜表面应力变化,实现胞外机械信号向胞内转导的通道,根据通透性分为离子选择性和非离子选择性通道,根据功能作用分为张力激活型和张力失活型离子通道。此外,还有细胞器离子通道,如广泛分布于哺乳动物细胞线粒体外膜上的电压依赖性阴离子通道(voltage dependent anion channel, VDAC),位于细胞器肌质网(sarcoplasmic reticulum, SR)或内质网(endoplasmic reticulum, ER)膜上的 Ryanodine 受体通道、IP₃ 受体通道。

离子通道的主要功能

离子通道的主要功能有:(1)提高细胞内钙浓度,从而触发肌肉收缩、细胞兴奋、腺体分泌、 Ca^{2+} 依赖性离子通道开放和关闭、蛋白激酶的激活和基因表达的调节等一系列生理效应;(2)在神经、肌肉等兴奋性细胞, Na^+ 和 Ca^{2+} 通道主要调控去极化, K^+ 主要调控复极化和维持静息电位,从而决定细胞的兴奋性、不应性和传导性;(3)调节血管平滑肌舒缩活动,其中有 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Cl^- 通道和某些非选择性阳离子通道参与;(4)参与突触传递,其中有 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Cl^- 通道和某些非选择性阳离子通道参与;(5)维持细胞正常体积,在高渗环境中,离子通道和转运系统激活使 Na^+ 、 Cl^- 、有机溶液和水分进入细胞内而调节细胞体积增大;在低渗环境中, Na^+ 、 Cl^- 、有机溶液和水分流出细胞而调节细胞体积减少。

离子通道病(channelopathy)

离子通道病是指离子通道的结构或功能异常所引起的疾病，具体表现在编码离子通道亚单位的基因发生突变或表达异常，或体内出现针对通道的病理性内源性物质时，离子通道的功能发生不同程度的减弱或增强，导致机体整体生理功能紊乱，形成某些先天性或后天获得性疾病，主要累及神经、肌肉、心脏、肾脏等系统和器官。迄今为止，研究比较清楚的离子通道病主要涉及钾、钠、钙、氯通道领域，简介如下：

(1) 钾通道病 钾离子通道在所有可兴奋性和非兴奋性细胞的重要信号传导过程中具有重要作用，其家族成员在调节神经递质释放、心率、胰岛素分泌、神经细胞分泌、上皮细胞电传导、骨骼肌收缩、细胞容积等方面发挥重要作用。已经发现的钾通道病有常染色体显性良性家族性新生儿惊厥(benign familial neonatal convulsions, BFNC)、1-型发作性共济失调(episodic ataxia type 1)、阵发性舞蹈手足徐动症伴发作性共济失调(paroxysmal choreoathetosis with episodic ataxia)、癫痫、1-, 2-, 5-, 6-型长 QT 综合征、Jervell 和 Lange-nielsen 综合征[3]、Andersen 综合征等。

(2) 钠通道病 钠离子通道在大多数兴奋细胞动作电位的起始阶段起重要作用，已经发现的钠通道病有高钾型周期性麻痹、正常血钾型周期性麻痹、部分低钾型周期性麻痹、先天性副肌强直、各型钾加重的肌强直、先天性肌无力、3-型长 QT 综合征、1-型假性醛固酮减少症、Liddle 综合征[5]、全面性癫痫热性发作叠加症(generalized epilepsy with febrile seizures plus)等。

(3) 钙通道病 钙离子通道广泛存在于机体的不同类型组织细胞中，参与神经、肌肉、分泌、生殖等系统的生理过程。已经发现的钙通道病有家族性偏瘫型偏头痛、低钾型周期性瘫痪、2-型发作性共济失调、6-型脊髓小脑共济失调、中央脊髓性肌病(central core disease of muscle)、恶性高热、Lambert-Eaton 肌无力综合征、癫痫等。

(4) 氯通道病 氯离子通道广泛分布于机体的兴奋性细胞和非兴奋性细胞膜及溶酶体、线粒体、内质网等细胞器的质膜，在细胞兴奋性调节、跨上皮物质转运、细胞容积调节和细胞器酸化等方面具有重要作用。已经发现的氯通道病有先天性肌强直(Thomsen 型)、隐性遗传全身性肌强直(Becker 型)、囊性纤维化病、遗传性肾结石病、3-型 Bartter 综合征等。

离子通道药物开发 (Ion Channel Drug Discovery)

离子通道因其结构和功能的独特性以及基础研究的逐渐深入，近年来以离子通道为靶点的药物开发越来越受关注，而且这也是一项高收益的工作，调查显示，目前以离子通道为靶点的药物销量占总销量的 13.4%。

另一方面，在药物早期的安全性筛选过程中，对 hERG 通道的毒副作用检测已经变成必需的步骤。目前发现几乎所有的临床药物所致的 LQT 或者 TdP 都作用于 hERG，且导致 hERG 抑制的药物

在化学结构上没有明显的共性，从而很难预测，仅有通过实验的方式给予解决。2004年，ICH和美国FDA都颁布关于非临床检测 I_{kr} (其中主要是hERG)的规章，要求药物上市时必须提供作用于离子通道的电流变化数据，否则新药不得用于临床。为此，新的早期药物安全评测方式需要引入制药研发过程中，以便及早发现候选化合物潜在的心脏毒性，尽可能减少新药研发的投资与风险。

离子通道研究方法

研究离子通道功能的最直接方法是用膜片钳技术直接测定通过离子通道的电流或测量细胞膜电位的变化。膜片钳技术是利用一个玻璃微吸管电极完成膜片或全细胞电位的监测、钳制和膜电流的记录，通过观测膜电流的变化来分析通道个体或群体的分子活动、探讨离子通道特性。分子生物学技术为离子通道的分子结构分析、基因克隆、功能表达研究提供了有力工具，对于编码离子通道亚单位的基因结构可采用基因定位克隆确定其在染色体上的定位，用逆转录-聚合酶链反应、Northern杂交等明确其在器官组织中的分布，用Western杂交检测基因表达产物等。荧光探针钙图像分析技术为检测细胞内游离钙离子浓度提供了有效手段，常用的荧光探针有Fura-2/AM、Indo-1/AM、Fluo-3/AM、Calcium Green等，将离子浓度图像记录和膜片钳记录结合，同时进行光电联合检测，从离子产生的离子浓度、图像变化和电信号变化多个方面研究离子通道，将获得更多的离子通道功能信息。

当然，膜片钳技术虽然被称为研究离子通道的“金标准”。然而，传统膜片钳是技术密集性的，需要经过良好训练的专业技术人员来操作，每次只能记录一个细胞(或一对细胞)，每天能获得的数据量仅为几到几十个，对实验人员来说是一项耗时耗力的工作，这些缺点注定了传统的膜片钳技术只能用在药物筛选的最后阶段和不需要记录大量细胞的基础实验研究中。

FLIPR实时荧光检测分析技术是采用实时加样、同步检测的技术配套使用成熟的荧光试剂盒(膜电位检测试剂盒、钾、钙等离子通道荧光试剂盒)实现对不同条件下(离子浓度变化、激动剂/抑制剂的添加、基因突变后通道功能的变化等等)，离子通道效应的改变，可以进行定量和定性分析。且操作流程简单、方法稳定、可重复性好。

CiPA 与心脏安全药理学评价

药物对于心血管系统毒副作用的测试是新药上市之前安全性评估的一个重要组成部分，而其中的核心部分则是测试药物分子对于心肌细胞上钾离子通道 hERG 的阻滞作用。临床上当 hERG 通道被药物阻滞之后，会造成心室过早收缩，形成尖端扭转性室速（Torsades de Pointes, TdP）和心率失常（Cardiac Arrhythmia），最后导致心室颤动而死亡。为此，ICH 在 2005 年制订了两份指南，其中 ICH S7B 是关于临床试验之前的实验室检测；ICH E-14 则是规定与之相关的临床实验指导。在临床上，目前公认的测试标准是通过人体心电图 Q 波和 T 波之间的距离（以毫秒为单位）来评估的。但是，QT 检测本身有其明显的局限性：首先，这种方法的特异性（specificity）不高，容易造成假阳性的结果，从而导致一些原本没有安全问题的药物研发被终止。其次，检测的标准很难确定。ICH E-14 最后的规定是药物导致的 QT 延长（相对基线和安慰剂）90% 上限不超过 10 毫秒。但实际上这个标准并没有大量数据的支持而存在很大的主观和随意性。最后，QT 临床试验属于一期临床，一般需要 30-50 名健康志愿者，并且试验剂量往往大大高于实际临床使用剂量，对志愿者有一定危险性，也给制药公司增加了研发费用和时间（QT 临床试验花费一般是 200-400 万美元，耗时 3-6 个月）。

基于以上原因，FDA 和工业界都希望心血管安全性评估能够在临床之前完成，然而目前的 ICH S7B 中推荐的检测项目和方法却不足以得出可靠的结论。为此，FDA 和工业界在 2014 年联合提出了 Comprehensive in vitro Proarrhythmia Assay (CiPA) 项目计划，旨在建立临床前药物心血管危险性评估体系和标准，其最终的目标是修改 ICH S7B 指导，从而让绝大多数新药可以免于做 QT 人体临床试验，以降低新药的研发费用。

最近的一些研究还发现：一些药物分子（比如：Verapamil and Ranolazine）会同时阻滞极化（Repolarizing）和去极化（Depolarizing）两个过程的离子流，造成其作用相互抵消。在这种情况下，我们可以在实验室中观察到药物对 hERG 通道的阻滞作用，但这些药物却不会诱发心律失常。如何把这类药物准确的区分开来，也是 CiPA 计划的研究目标之一。

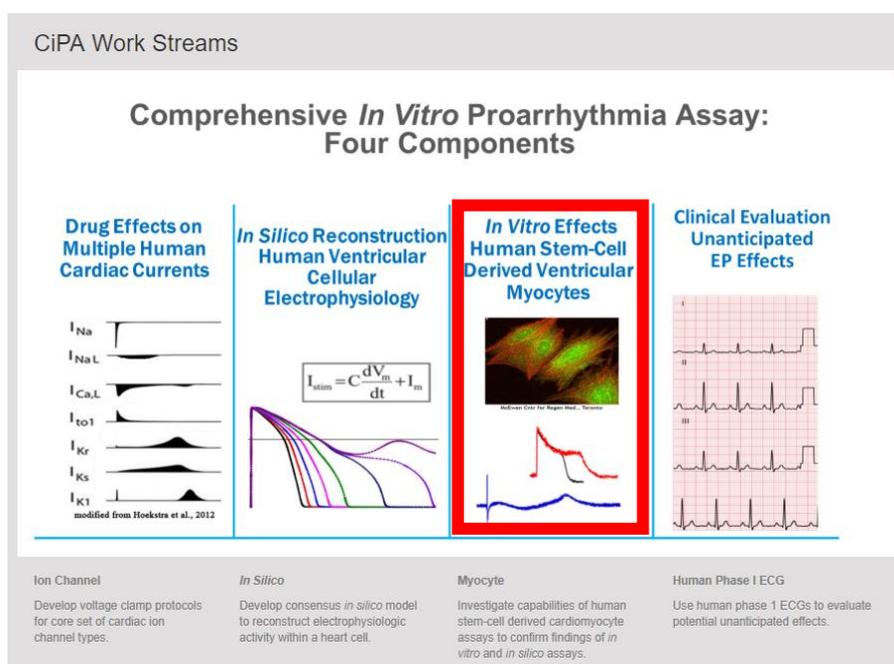
CiPA 策略在临床前评估药物心脏安全性包括：

- ✓ 研究药物对人类心脏多个离子通道功能的影响
- ✓ 将离子通道功能的影响结果整合建立计算机模型（In silico 模型），预测药物引发的复极化变化
- ✓ 在人源干细胞分化的心肌细胞（human stem cell-derived cardiomyocytes, hSC-CMs）上验证已观察到的药物对动作电位的影响。

- ✓ 最后再辅以临床 I 期研究中对人体 ECG 的评估，构成了完整的 CiPA 策略。

FLIPR 系统在 CiPA 项目中的应用

新的 FLIPR Penta 高通量实时荧光检测分析系统有一个新的可选高速 EMCCD 相机（HS EMCCD）和新的 Peak Pro 2 软件模块，可让您对分化为心肌细胞和神经元的人源诱导多能干细胞（hiPSC）进行峰值检测和分析的频率多达每秒 100 次，并快速选出早后除极（EAD）类似事件、纤维性颤动和不规则搏动等事件。

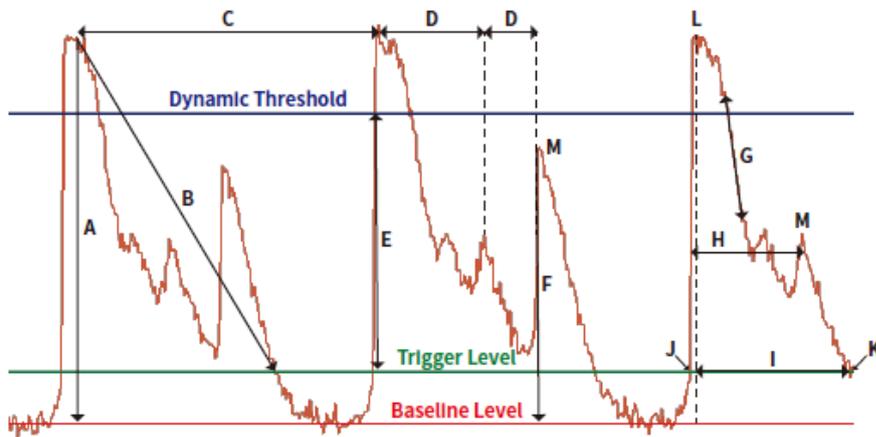
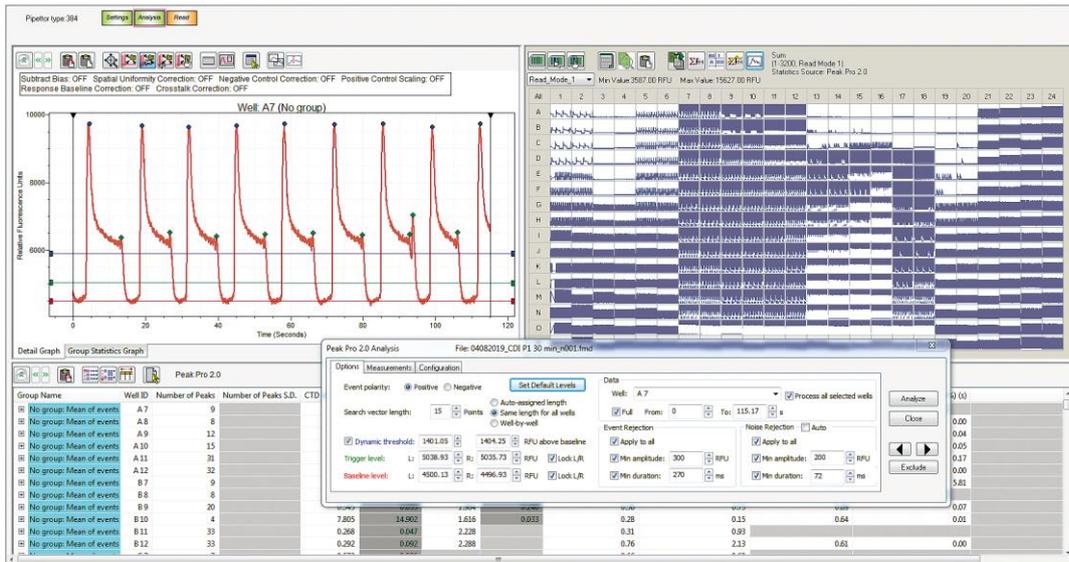


对于 CiPA 计划，FLIPR 主要应用与第三阶段，也即是在人源干细胞分化的心肌细胞（human stem cell-derived cardiomyocytes, hSC-CMs）上验证已观察到的药物对动作电位的影响。通过整体细胞的荧光信号以及高频钙振荡峰型的变化，多参数分析候选药物多心脏安全性的影响，实现高通量早期毒性筛选和化合物安全性评价。

FLIPR Penta 系统具有仪器硬件灵活性和易于使用的软件界面，这些都可以帮助您把握这些方式的转变。

新亮点包括：

- ✓ 高速、高灵敏度 EMCCD 相机，用于荧光和发光检测
- ✓ 高达 100 赫兹的数据采集
- ✓ Peak Pro 2 分析模块，便于振荡异常的检测
- ✓ 超过 30 个峰值测量选项

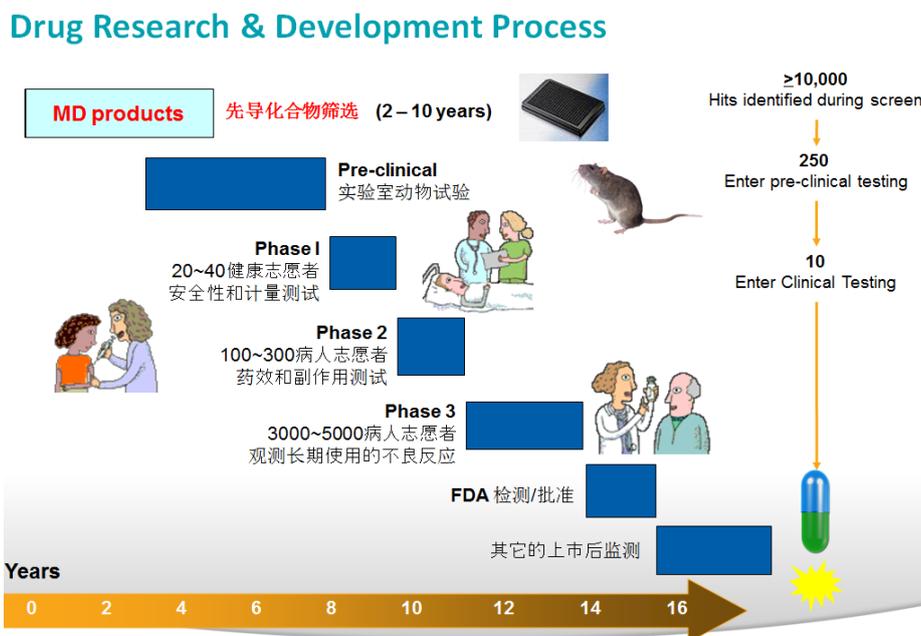


- A 主峰振幅
- B 线性衰减斜率
- C 计算峰值速率所用的主峰间距 (PpM)
- D 早期后除极样事件 (EAD-like event) 间隔, 用于计算 EAD-like 事件 (PpM)
- E 上升斜率
- F EAD-like 事件振幅
- G 衰减斜率
- H 钙瞬态持续时间 (CTD)
- I 从峰值位置的钙瞬态时间 (CTDP90)
- J 事件开始
- K 事件结束
- L 主峰
- M 早期后除极样事件 (EAD-like)

FLIPR 在创新药物开发中的应用

一个小分子新药从研发到临床使用历时十年以上，耗资 10~30 亿美金。平均而言，每一百万个化合物中最终能被 FDA 批准上市的只有一个，而上市的药物中，也只有 30% 的药物能够获得利润，收回其研发成本。制药公司年收入的 20% 用在新药的研发上，全球每年在新药上的投资超过 300 亿美金。在先导化合物的后续筛选过程中，40% 到 60% 的先导化合物在后续的 ADME/T (药物吸收、分布、代谢、分泌和毒性检测) 中被淘汰。72% 的药物研发费用被浪费在日益增长的临床耗费、体内无法预测的调控环境以及药物的副作用方面。

因此，选出优良品质的先导化合物是药物筛选的一个至关重要的过程。各制药公司在药物开发的早期都会收集尽可能多的关于靶点、待测化合物性质、以及现有筛选方法手段优劣性的信息，以确保尽快剔除阴性化合物，拿到优良品质的先导化合物，降低药物筛选的成本。



药物筛选，就是对可能作为药用的物质进行初步药理活性的检测和试验。对创新药物来讲，筛选是必不可少的手段和途径，特别是当代创新药研究竞争十分剧烈，其中竞争的焦点就在于新药筛选，低耗、高效率筛选出新药是问题的核心，其目标是缩短新药发现的过程。

Molecular Devices 公司一直致力于为传统的小分子和大分子药物开发提供革新性的解决方案。其产品以高通量、节省成本、高自动化、高稳定性、容易操作使用等特点著称于业内，被业内公认为高通量药物筛选技术领域的领导者。全球任一大型的药物研发公司中，都能找到 Molecular Devices 的仪器和试剂。Molecular Devices 在药物筛选领域中的“领导者”头衔是我们的客户赋予的，也是客户跟我们的长期合作过程中对我们的期望。Molecular Devices 的理念是不断满足用户需求的同时始终关注用户的成功。

FLIPR 高通量实时荧光检测分析技术的主要应用

主要应用方向和技术方法

主要用于生命科学研究和高通量药物筛选，例如分子生物学、植物学、遗传学、动物学、微生物学、病理学与病理生理学等学科研究。主要包括几个大的方面：

- (1) 用于 GPCR 受体活动监测的细胞内钙信号变化实时测定；
- (2) 用于监测离子通道活动的细胞膜电位变化实时测定；
- (3) 心肌安全性早期毒性评价；
- (4) 细胞内 pH 值变化的实时监测。

具体的技术方法还包括：

- (1) 比值法钙离子流信号实时监测；
- (2) cAMP、cGMP 等第二信使水平变化的检测；
- (3) 膜转运体、脂肪酸等蛋白活性的检测等等。

同时 MolecularDevices 公司在结合这些常用的应用基础上还推出了特有的试剂检测系统，包括有：

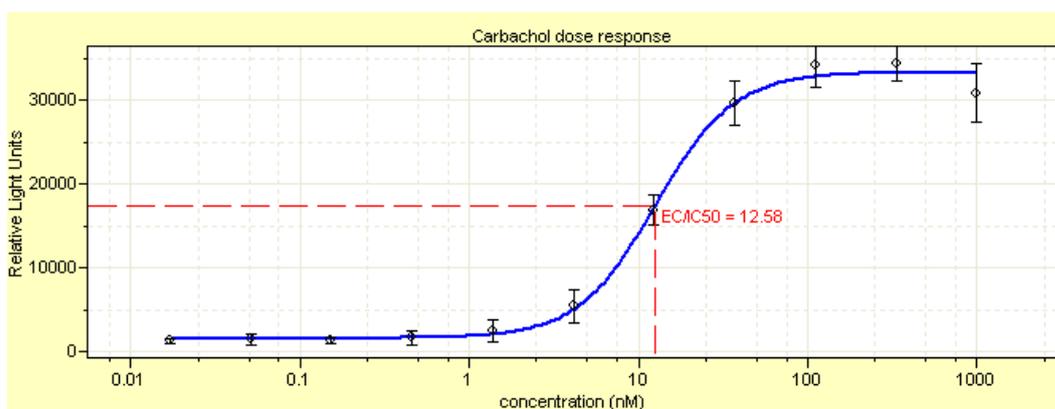
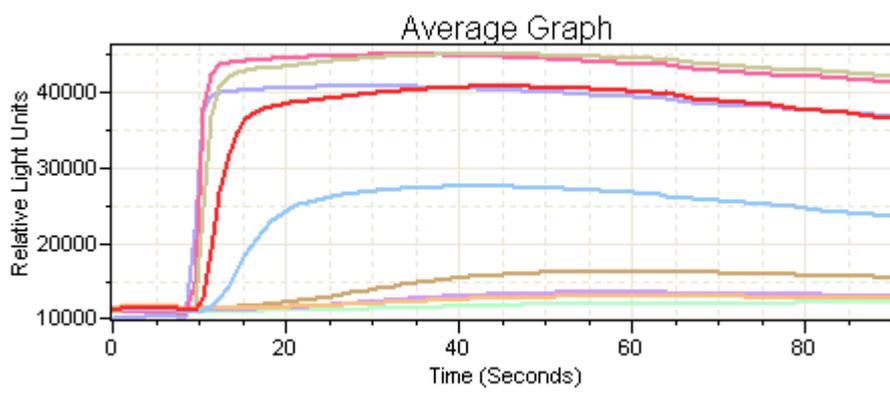
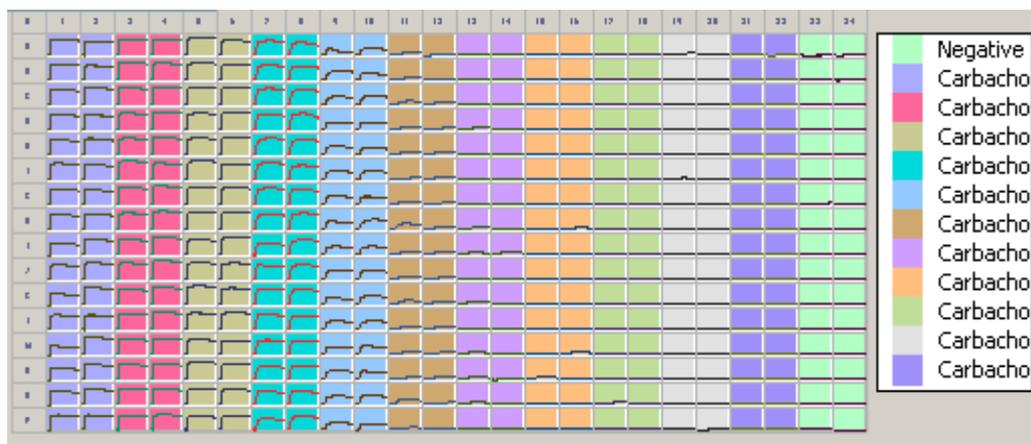
- (1) GPCR:高效高信噪比钙试剂盒： Calcium 5 和 Calcium 6 Assay Kit; FLIPR LiveWare; Fura-2 QBT 试剂盒；
- (2) 离子通道： FLIPRPotassium Assay Kit ; FLIPR® Membrane Potential Assay Kit; 等
- (3) 心肌早期毒性检测： EarlyTox Cardiotoxicity Kit;
- (4) 膜转运体：神经递质摄取转运体试剂盒和 QBT™脂肪酸摄取转运体试剂盒；
- (5) 兼容第三方试剂盒

所有 MD 公司的试剂盒均有具有免洗功能以及干扰信号遮蔽技术，可增加信噪比。有多种规格可供选择。

FLIPR 系统检测细胞内钙离子浓度的变化

(1) 内源性表达的 M1 受体

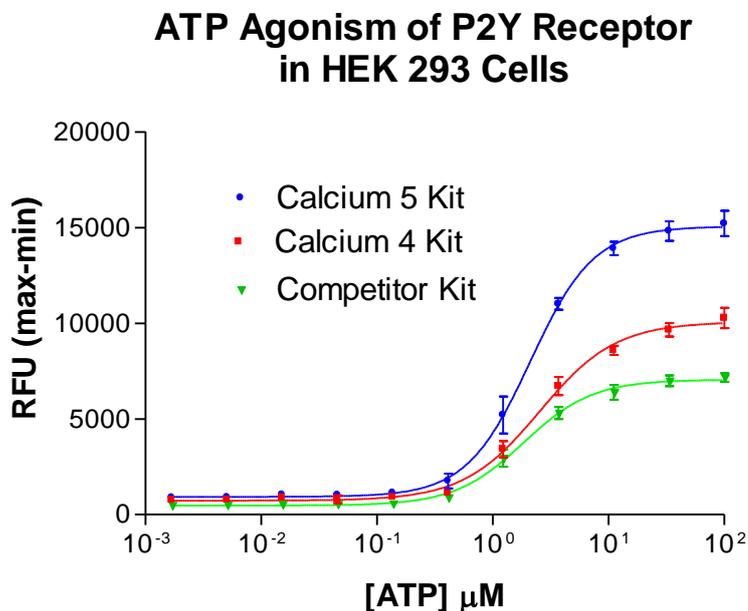
内源性表达 M1 受体的 CHO 细胞上测定激动剂 Carbachol 诱导的钙离子浓度变化



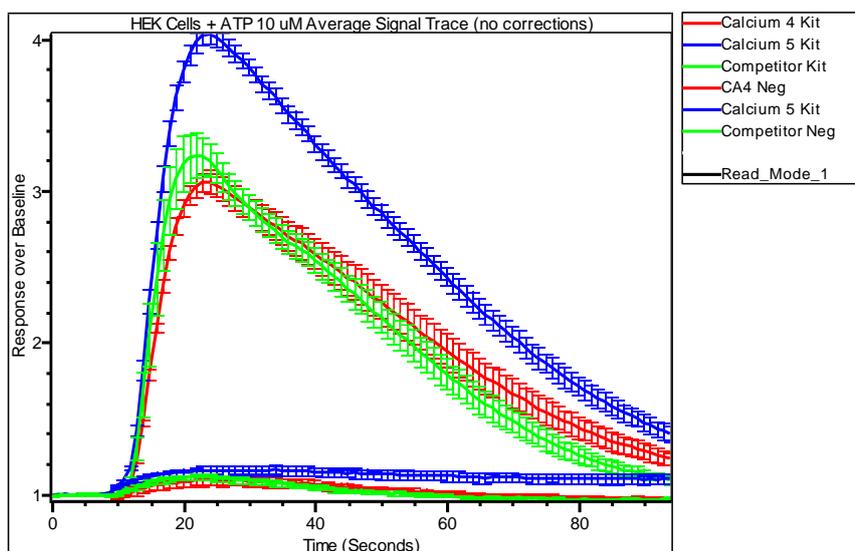
以上为软件界面截屏图。运用 ScreenWorks™系统软件可实现从原始数据获取到完成统计分析一体化。

(2) P2Y 受体的 ATP 激动效应

ATP 在表达 P2Y 受体的 HEK293 细胞上诱导的钙离子浓度变化



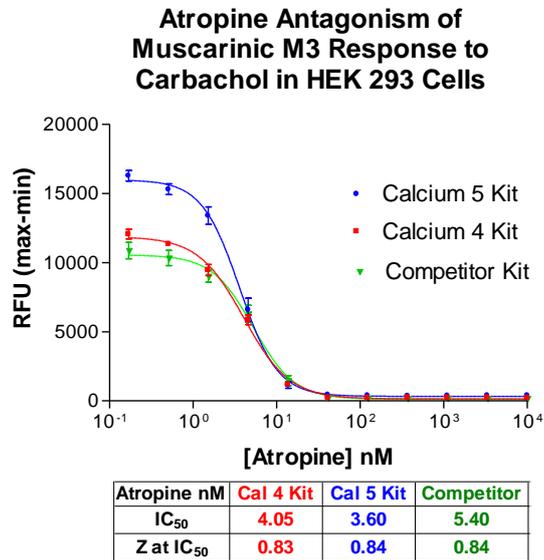
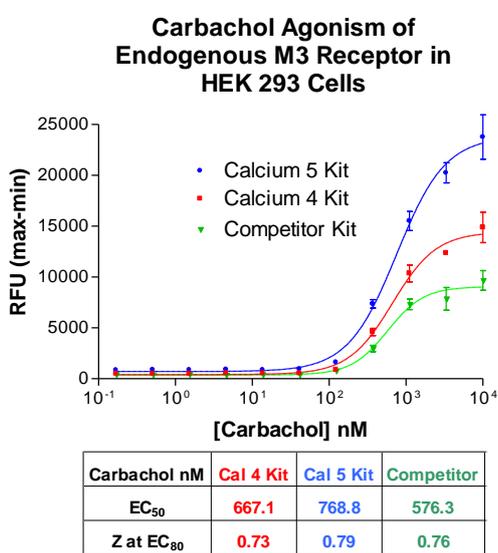
ATP uM	Cal 4 Kit	Cal 5 Kit	Competitor
EC ₅₀	2.55	2.11	1.85
Z at EC ₈₀	0.67	0.88	0.78



上图为统计图，下图为 FLIPR 软件 ScreenWorks 界面上钙离子浓度变化过程的原始图。本实验使用了 Calcium 4 Kit 和 Calcium 5 Kit 以及其他公司生产的类似试剂盒。

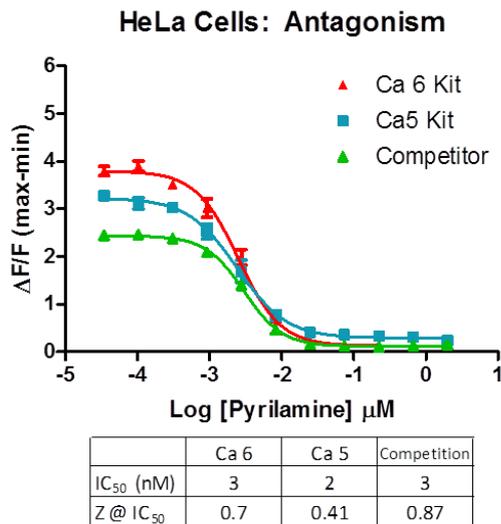
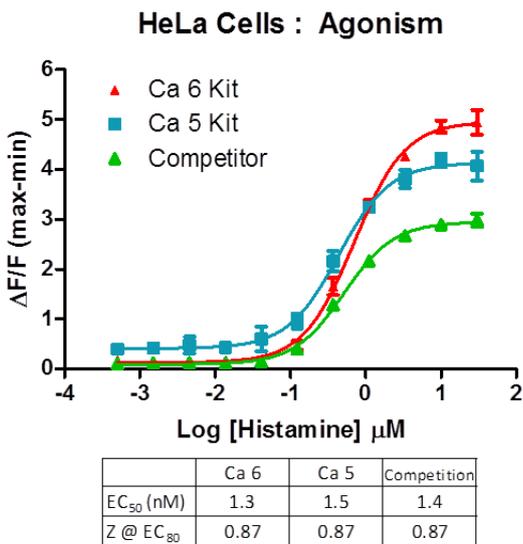
(3) 内源性表达的 M3 受体

内源性表达 M3 受体的 HEK293 细胞上，激动剂 Carbachol 诱导的钙离子浓度变化以及相应的阻断剂 Atropine 的拮抗效应。

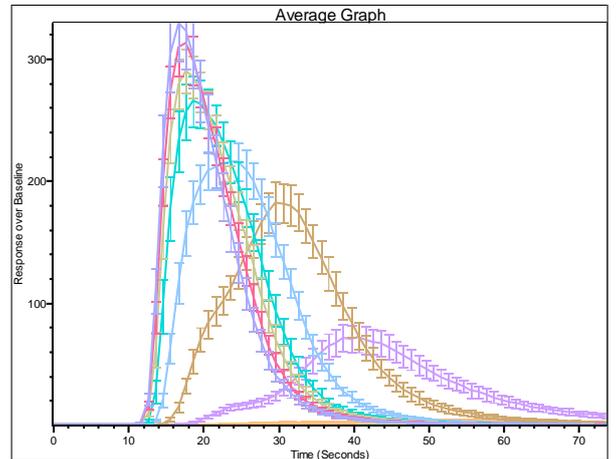
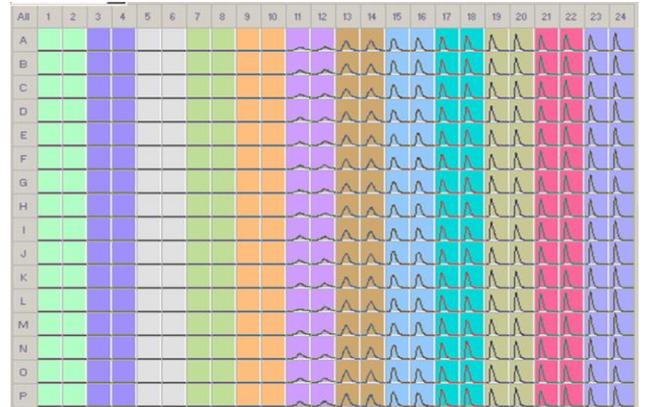
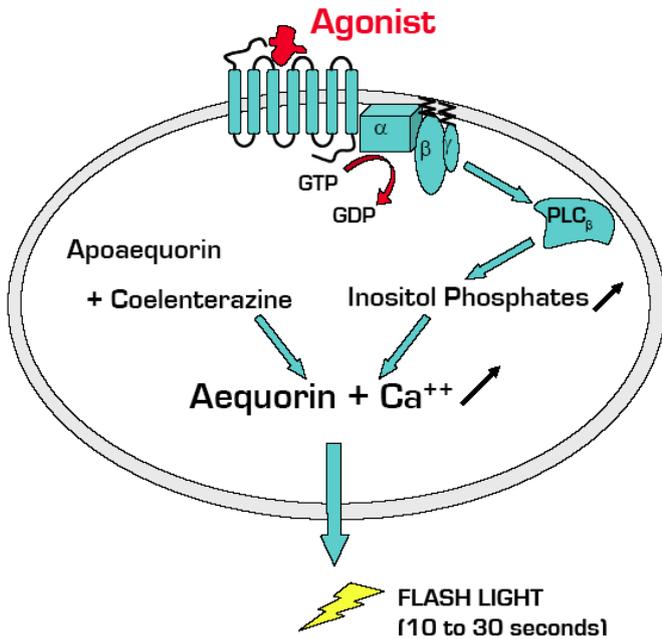


(4) 内源性表达的 H1 受体

内源性表达H1受体的HeLa细胞上，激动剂Histamine诱导的钙离子浓度变化以及相应的阻断剂 Pyrilamine的拮抗效应。



(5) 化学发光方法检测细胞内钙离子浓度变化

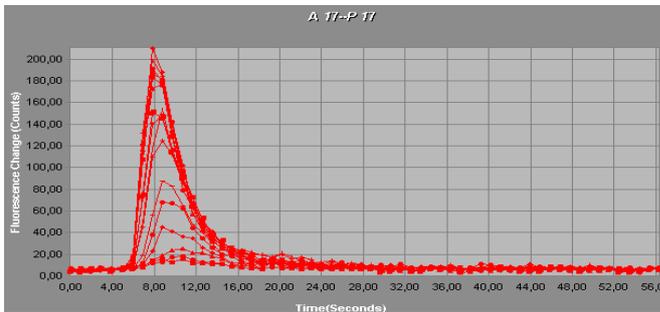


原理：Aequorin 是一种来源于水母 *Aequorea Victoria* 的发光蛋白。将 Aequorin 的前体蛋白复合体 Apoaequorin 和目标受体的基因转染到细胞系内表达，然后用 coelenterazine 孵育细胞。Coelenterazine 催化 Apoaequorin 转变成 Aequorin，Aequorin 与钙离子结合后发光。

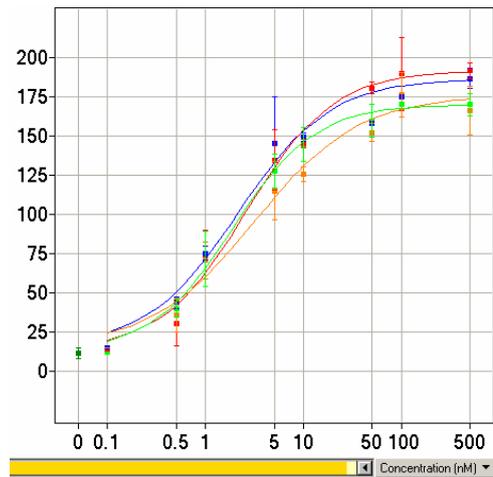
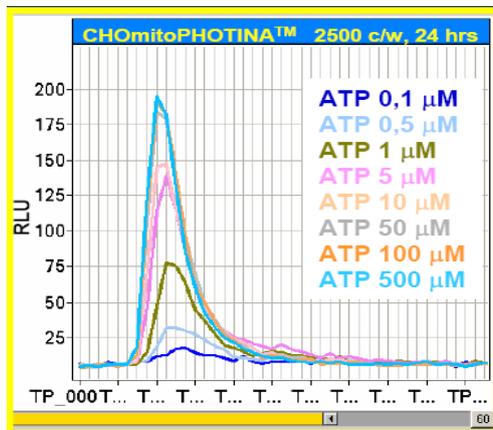
Photina 也是一个钙敏感的发光蛋白。氨基酸序列上与 Aequorin 有 70%的相似性，但它发的光强度高，持续时间长，便于检测。

a) 使用 Photina, 激活 P2Y 受体诱导的钙离子浓度变化

Dose response curves for multiple cell densities

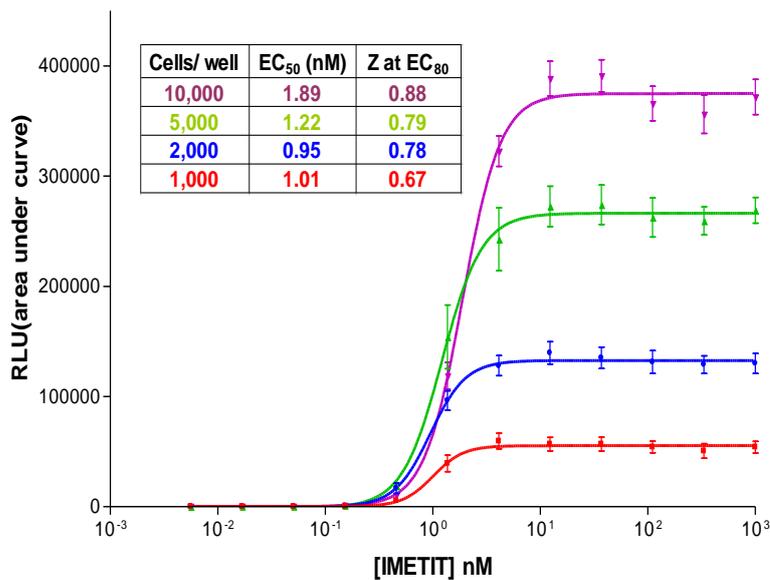


Cells/Well	EC ₅₀	R ²
2,500	2,6 μM	0,988
5,000	3,1 μM	0,979
7,500	1,8 μM	0,995
10,000	2,1 μM	0,974



b) 使用 Photina, 在内源性表达 H3 受体的 CHO 细胞上测定 IMETIT 诱导的钙离子浓度变化与细胞密度的关系

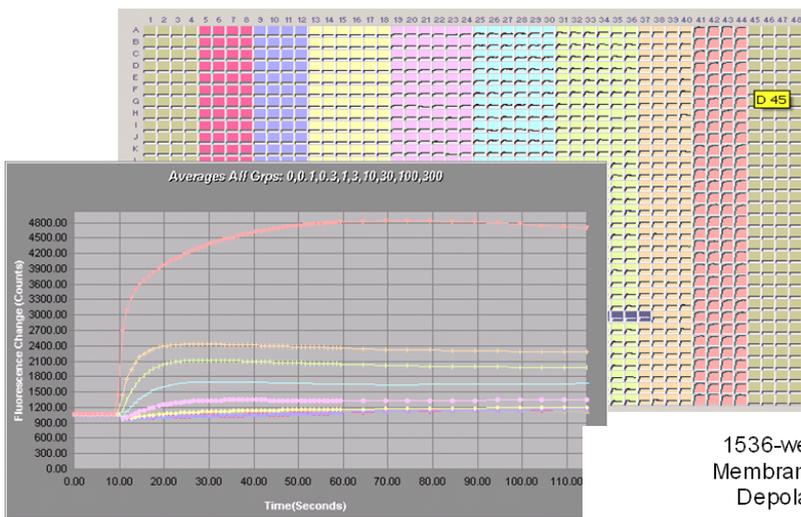
384-Well Photina® CHO H3 Cell Titration vs. IMETIT Dose



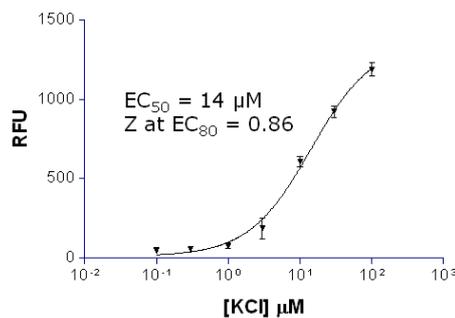
膜电位检测：在 CHO 细胞上测定 KCl 诱导的去极化

原理：静息状态下，细胞膜两侧存在电位差，处于极化状态。将细胞孵育于电压敏感的荧光指示剂和 Masking dye 中，荧光指示剂附着于细胞膜外侧，并为 Masking dye 所掩盖。当细胞膜上的离子通道打开或由其他原因导致细胞的去极化时，荧光指示剂移至细胞膜内侧，但 Masking dye 不能进入细胞，荧光指示剂的荧光释放，因此可以检测到荧光信号。

- 使用 FLIPR membrane potential red kit，在 CHO 细胞上测定 KCl 诱导的去极化

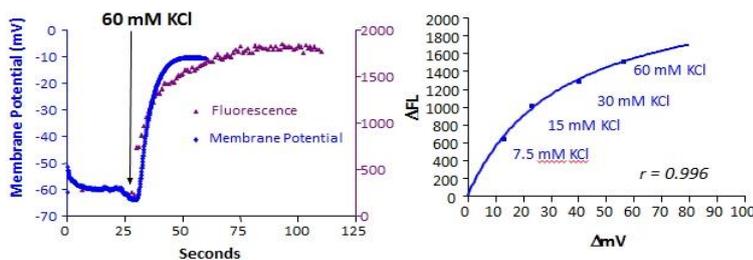


1536-well FLIPR^{TETRA} and Membrane Potential Red Kit: Depolarization by KCl in CHO Cells



Conc.	Average	Std. Dev.	% CV	Z'
0	46.83	5.48	11.71	-
0.03	48.35	7.62	15.76	-24.95
0.1	55.81	9.79	17.55	-4.11
0.3	76.27	18.33	24.04	-1.43
1	187.33	65.95	35.21	-0.53
3	609.74	32.35	5.31	0.80
10	923.17	35.81	3.88	0.86
30	1188.53	43.21	3.64	0.87
100	2877.64	150.87	5.24	0.83
300	46.83	5.48	11.71	-24.95

- V_m measured by current clamp vs. FMP for a voltage-gated potassium channel



Data courtesy of Dr. Michael Xie, Millennium Pharmaceuticals

膜电位检测：Nav1.5 通道特性研究

电压门控离子通道表达于心脏、骨骼肌、脑神经细胞的可兴奋性细胞膜上。阻断或调控这类通道可能会有治疗效应，或也许干扰到正常细胞功能。从而，可以影响电压门控离子通道的化合物成为药物研发中重要的靶标。心肌 Nav1.5 通道被归类为“河豚毒素（TTX）耐受型”。Nav1.5 通道药理学意义在于其是抗心律失常药激活的靶标且被局麻药如利多卡因阻断。

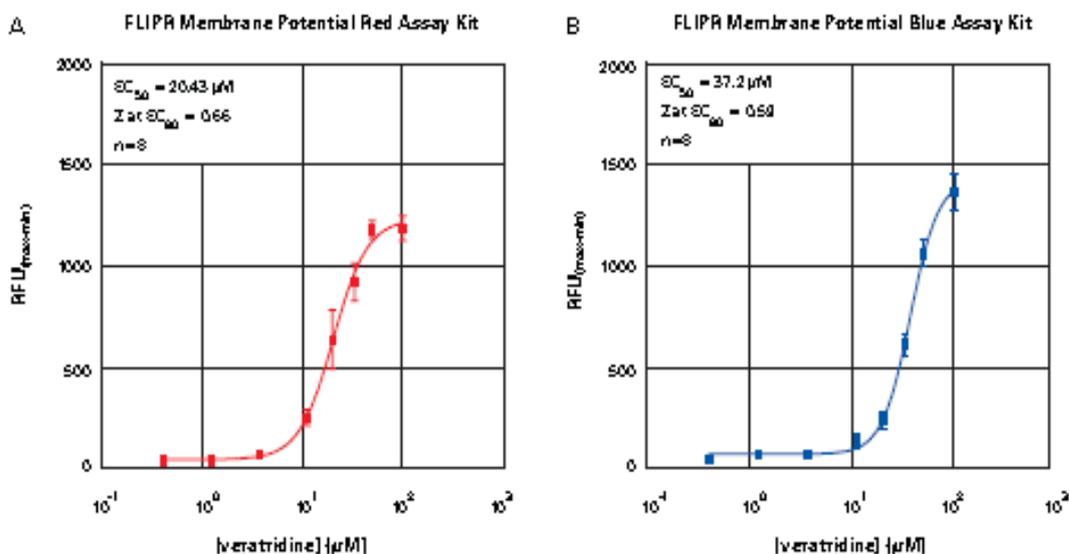


图 1. 藜芦定在 Nav1.5 通道上的效应。藜芦定 EC₅₀ 曲线的比较 (A) FLIPR 膜电位红色试剂盒结果。(B) FLIPR 膜电位蓝色试剂盒结果显示藜芦定效应存在轻微的差异。

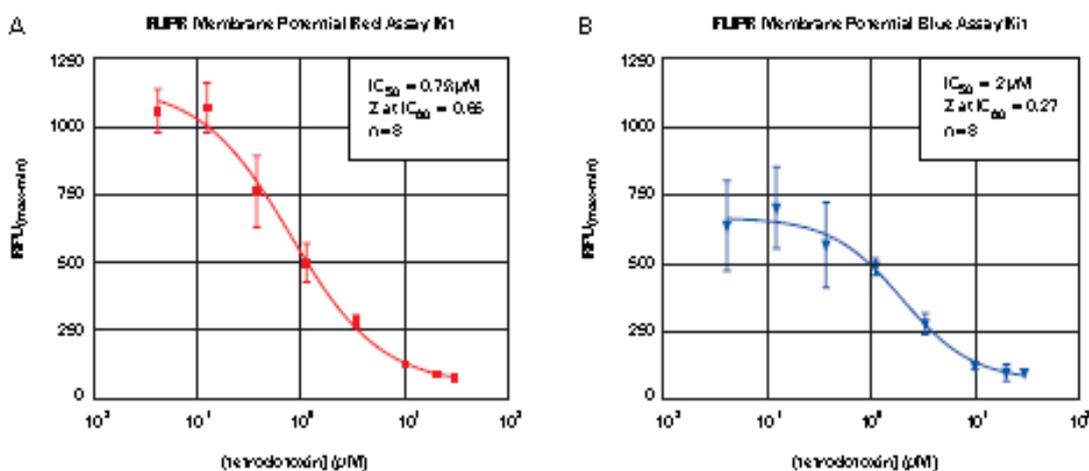
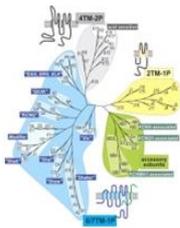


图 2. TTX 对 CHL 细胞上表达的 Nav1.5 的调控。河豚毒素 IC₅₀ 曲线的比较。(A) FLIPR 膜电位红色试剂盒。(B) FLIPR 膜电位蓝色试剂盒。在 FMP 红色试剂盒检测结果中可得到更高的 Z 因子值

钾离子通道：hERG 通道阻断剂特性的分析

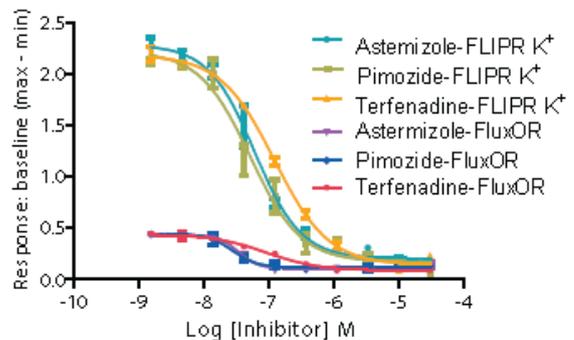
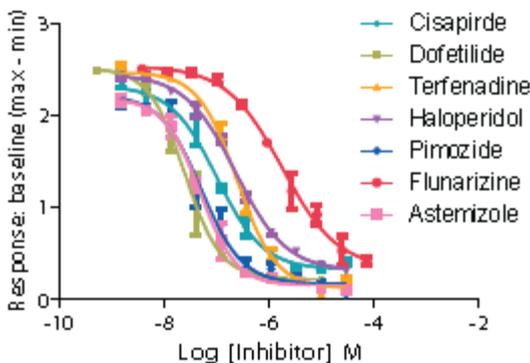
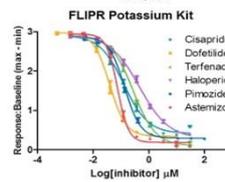
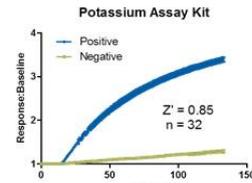
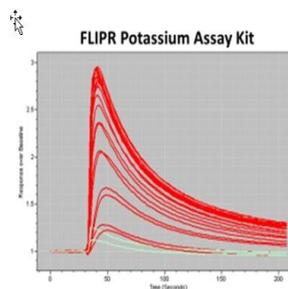
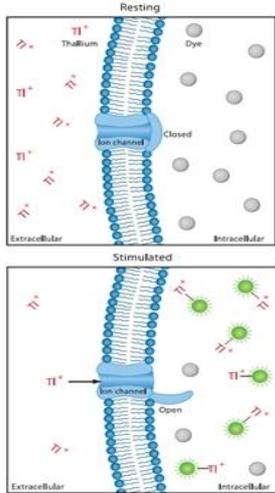
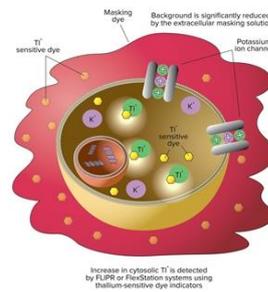
药物诱导的 hERG (human ether-a go-go-related gene) 离子通道被阻断可能导致严重的致死性室性心律失常——尖端扭转型室性心动过速 (torsade de pointes, TdP)。此处展示了一种新型钾离子通道检测试剂盒在 FLIPR^{TETRA} 实时荧光检测分析系统上对 hERG 阳性化合物的效应进行了评估和检测。实验根据钾离子(K⁺)通道对铯离子(Cs⁺)的通透性，采用了对铯离子敏感的荧光染料作为指示剂。实验对几种常见的 hERG 阳性抑制剂的药理效应进行了检测。

➤ 钾离子通道的检测原理和结果分析



Potassium channels represent the single largest group of ion channels

- Detection of potassium-permeable channels
 - K_V
 - K_{ir}
 - K_{ca}
 - KCNQ
 - hERG
- Molecular Devices
 - **FLIPR[®] Potassium Assay Kit**
 - 475-495nm excitation
 - 515-575nm emission

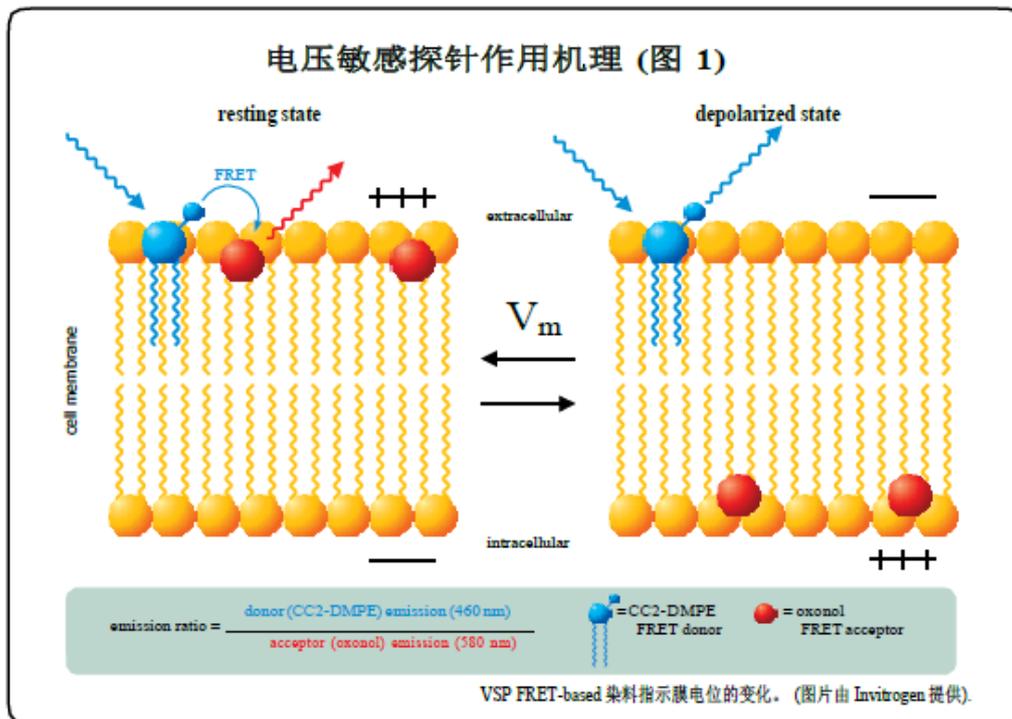


阳性化合物对 hERG 通道的浓度依赖性阻断效应

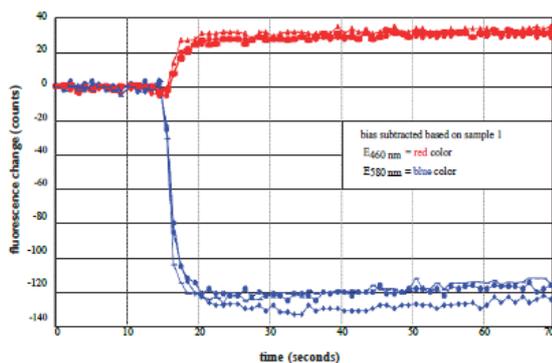
FLIPR 钾离子通道检测试剂盒与 FluxOR 结果对比

电压敏感探针：比率检测内向整流钾通道（Kir）的变化

原理：电压敏感探针是一种基于荧光共振能量转移（Fluorescence Resonance Energy Transfer，FRET）原理的用于高通量离子通道药物研发的实验技术。FRET 供体--香豆素-磷脂（coumarin-phospholipid, CC2-DMPE）只结合在细胞膜外侧。FRET 受体是可移动的、带负电荷的疏水性类菁染料化合物染料（oxonol）[DiSBAC2(3)或 DiSBAC4(3)]，根据膜电位变化结合在细胞膜的一侧。静息细胞膜电位是负的。因而，两个探针都结合在细胞膜的外侧，实现有效的 FRET 效应。390–420nm 波长 LED 激发 CC2-DMPE 供体探针，从 oxonol 受体探针处产生 580nm 波长强的红色荧光信号。当细胞膜电位变正后，例如 KCl 引起的细胞去极化，oxonol 受体探针快速的改变位置至膜的另一侧。因此，每个 oxonol 受体探针对细胞电位变化“感受”并反应。这种转移位置打破了 FRET 效应，CC2-DMPE 供体探针激发后在 460nm 波长产生了强的蓝色荧光信号。

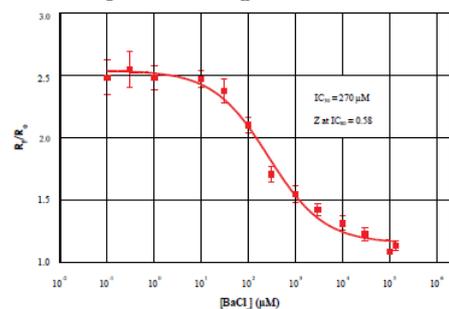


Dual-Wavelength Vsp Trace from the FLIPR^{TETRA} System (Figure 2)



Dual-wavelength VSP trace from the FLIPR^{TETRA} System

BaCl₂ Inhibition of K_{ir} in RBL-2H3 Cells (Figure 3)

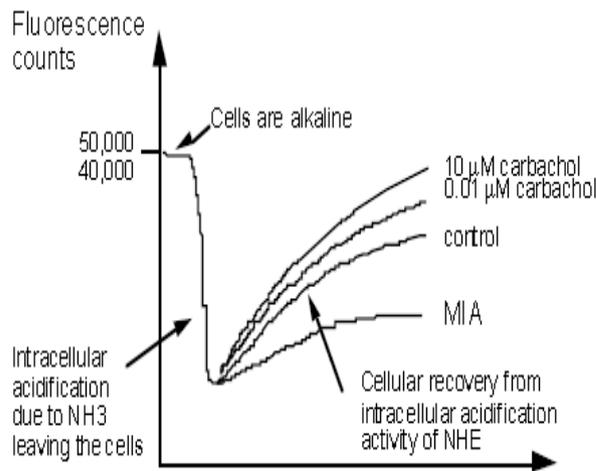


Barium chloride inhibition of K_{ir} inward rectifying potassium channel response in rat basophilic leukemia cells as determined by VSP ratiometric assay dyes.

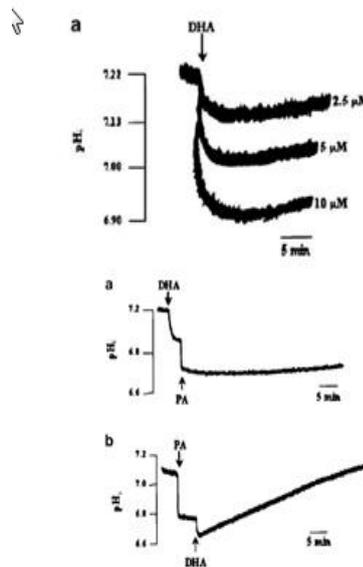
FLIPR 系统检测细胞内 PH 值变化

细胞内 pH 实验的原理

Na⁺/H⁺ exchanger (NHE) 排出氢离子同时泵入钠离子，以维持 pH 稳定性。BCECF 是 pH 敏感的染料，其在碱性条件下吸光度更高，反之酸性条件下变低。从而 BCECF 可被用于监测细胞内 pH 变化进而反应 NHE 活性。加入 BCECF 孵育细胞，之后加入 NH₄Cl, NH₄Cl 有助于促进染料进入细胞内，且 NH₃ 会造成碱性环境（高荧光信号）。当 NH₄Cl 被 FLIPR 加入的溶液稀释后，NH₃ 扩散出细胞，导致细胞内 H⁺ 浓度升高，进而引起荧光信号的快速下降。这些 H⁺ 将会被 NHE 泵出细胞（荧光信号的缓慢升高与 NHE 活性是相对应的）。



为了观察细胞内 PH 值变化，需要在细胞中加载 pH 敏感的荧光染料。不同的细胞类型其染料加载方案需要进行优化。迄今为止，BCECF 是最广泛用于细胞内 pH 值检测实验的荧光染料试剂。



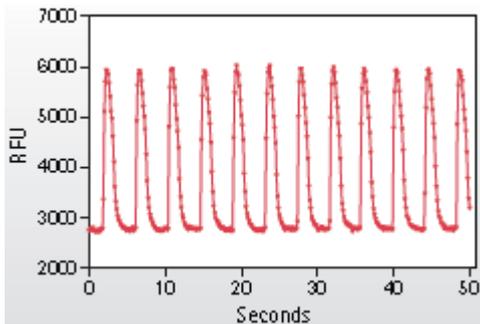
Virginie Aires et al. British Journal of Pharmacology (2003) 140, 1217-1226

药物研发早期 EarlyTox™ 心肌毒性检测

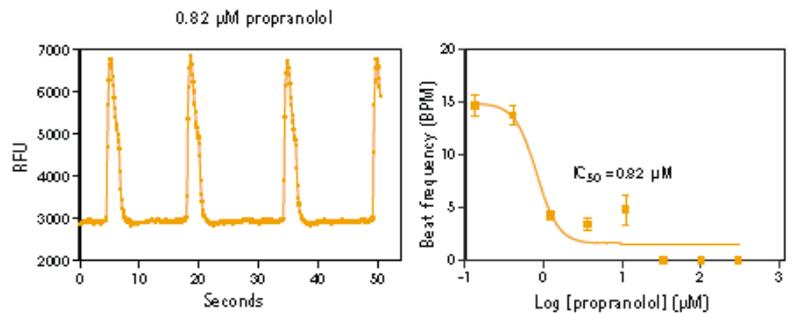
在药物研发早期进行心急性毒性评价是非常重要的，以便于排除潜在的有毒副作用的化合物，从而开展进一步的研究。高度预测性的生物相关性体外高通量筛选分析实验对于提高效率和降低心脏安全性评价失败的化合物筛选的高成本来说是至关重要的。干细胞分化的心肌细胞是特别完美的细胞模型，因为它们表达了 GPCRs 和离子通道，表现出自发的类似原始心肌细胞的机械的和电学活性。

在单个的心跳周期内，肌质网被激活后 Ca²⁺被释放进入胞质内。钙结合肌钙蛋白激活肌小节，引起细胞收缩。同步地，细胞中染料分子与游离的钙离子结合增加了荧光信号强度。

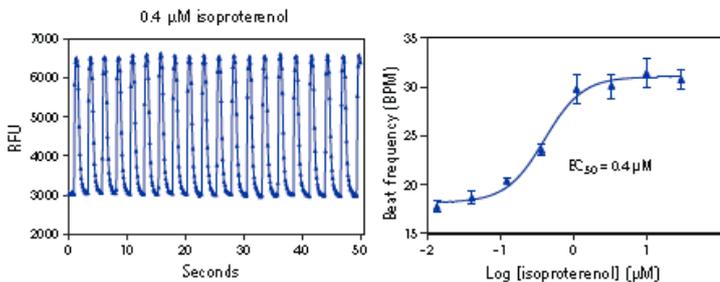
心肌细胞舒张发生于钙离子泵把细胞内的钙离子摄取回肌质网并和细胞外液进行钙离子交换时。荧光信号强度随着钙离子浓度降低而减小。随着下一个心跳周期重复开始，荧光信号峰值随着心跳同步被记录。



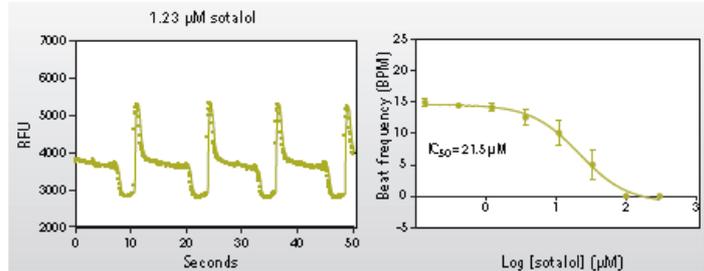
未做处理的 iPSC 心肌细胞添加了 EarlyTox 心肌毒性染料孵育 2 小时后的钙离子峰值信号



普萘洛尔是非选择性的 β₁ 和 β₂ 肾上腺素受体阻断剂，抑制 β 肾上腺素受体激动剂的作用。其降低了 iPSC 心肌细胞的钙信号峰值频率。



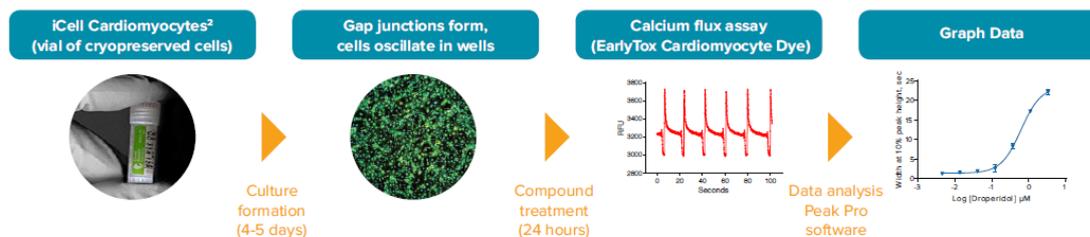
异丙肾上腺素是 β 肾上腺素受体的非选择性激动剂，表现出正性变时效应和正性肌力作用。其增加了 iPSC 心肌细胞的钙信号峰值频率。



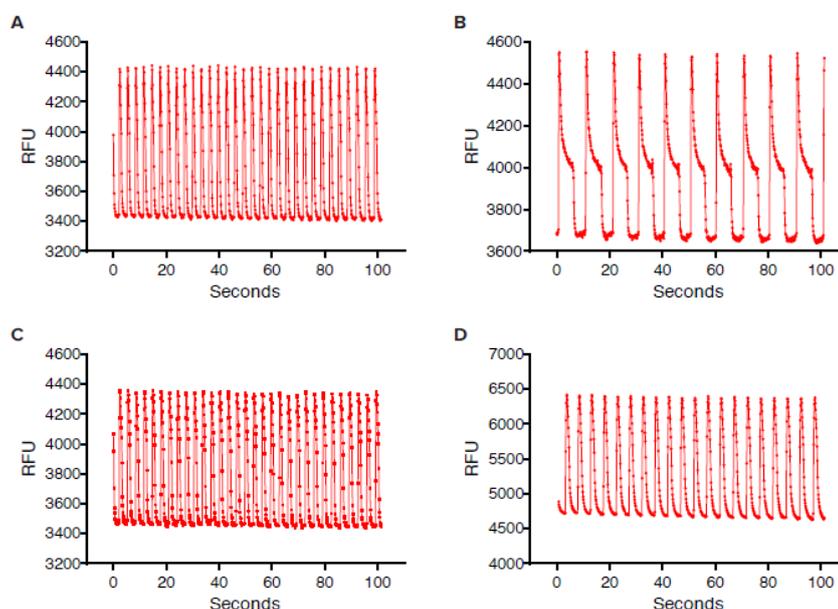
索他洛尔是非选择性的竞争性 β 肾上腺素受体拮抗剂且其同时也对 hERG 有抑制作用。其不仅降低了 iPSC 心肌细胞钙信号峰值频率，还改变了正常的跳动波形图。

iCell 心肌细胞钙振荡检测

药物有效性和安全性筛选成本的持续增加导致了对创新技术的需求，从而在药物发现过程中更早地进行表征和特性的检测分析。FDA 正在制定化合物检测的指导方针，以确保药物的安全性，使得药物无需因为不良反应而撤市，例如阻断心脏 hERG 通道，并导致像尖端扭转型室性心律失常这样的症状。这一方向被称为全面的体外心律失常试验或 CiPA 项目。



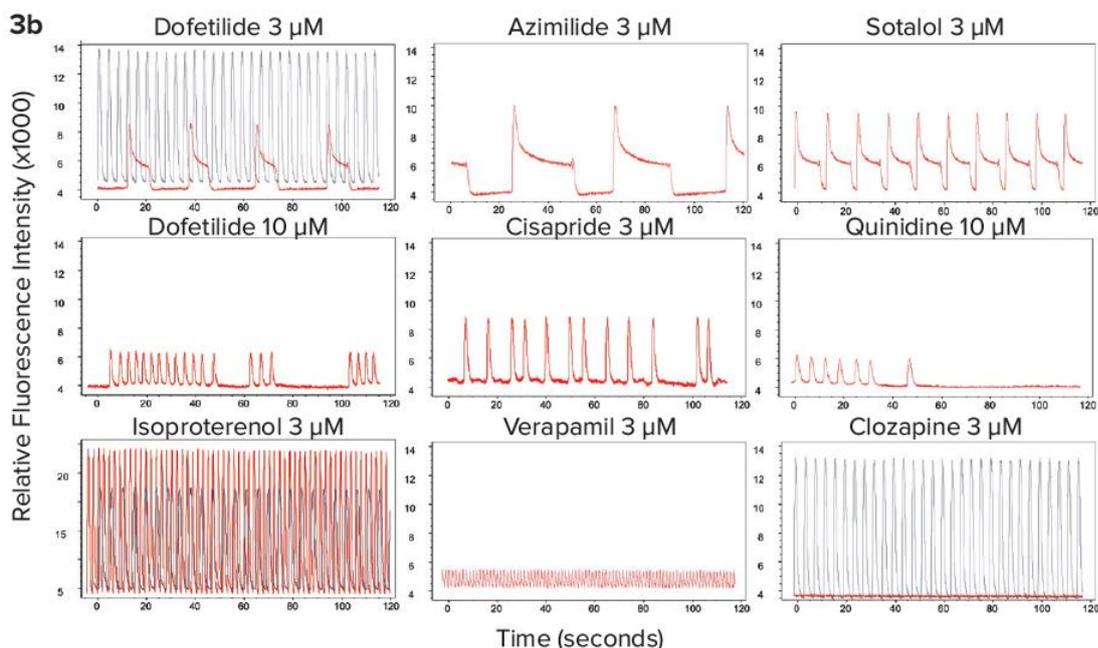
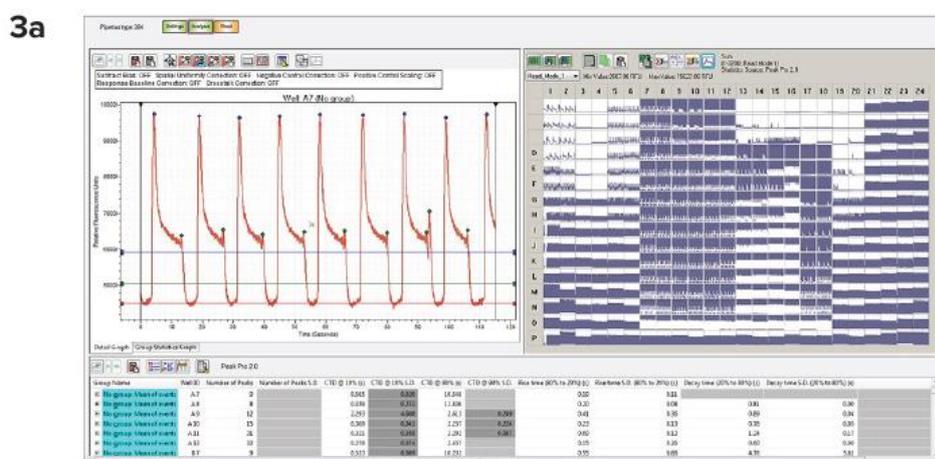
使用 FLIPR^{Tetra} 系统检测钙振荡变化的 iPSC2 心肌细胞工作流程



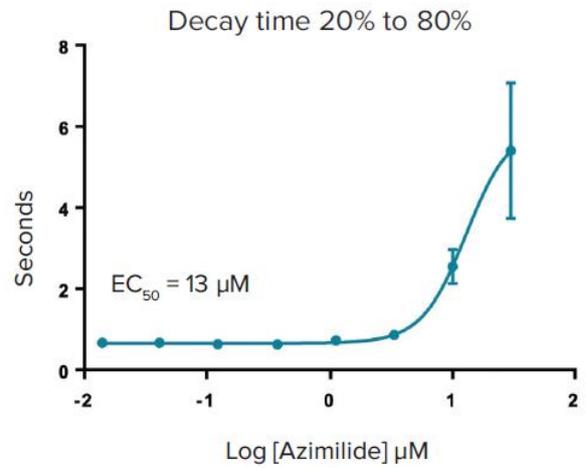
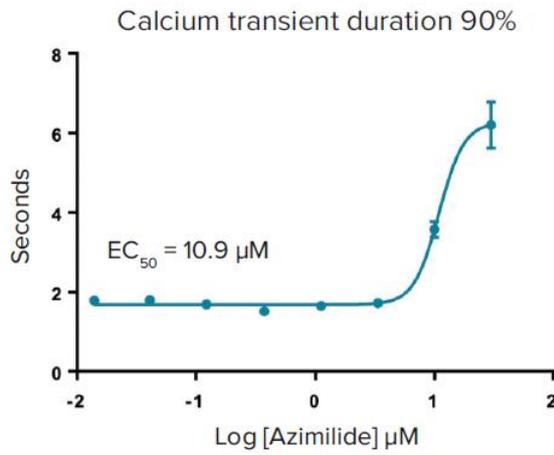
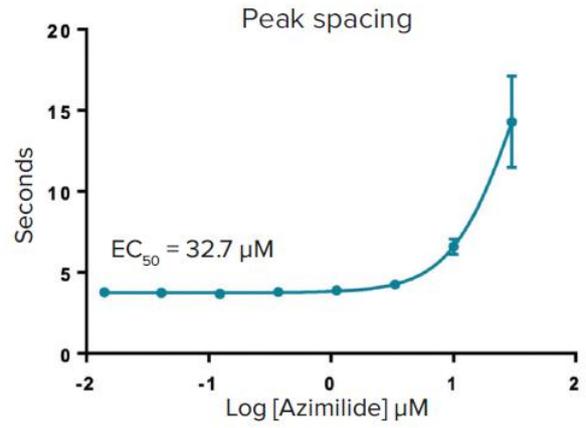
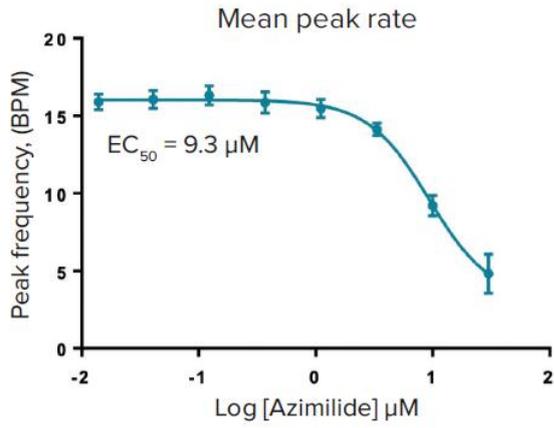
iPSC2 心肌细胞中的钙振荡信号。(A) FLIPR Tetra 系统上检测的对照组钙振荡信号。(B) iPSC2 细胞接触 1 μ M 舒尼替尼 24 小时后的钙振荡信号。(C) iPSC2 细胞接触 1 μ M 紫杉醇 24 小时后的钙振荡信号。(D) iPSC2 细胞接触 1 μ M 阿霉素 24 小时后的钙振荡信号。

化合物诱导人 iPSC 来源的心肌细胞心律失常的多参数评估

开发生物相关和预测细胞为基础的化合物筛选和毒性评估的检测方法是药物发现的一个主要挑战。本研究的重点是利用人诱导多能干细胞(iPSC) 来源的心肌细胞建立高通量兼容的心脏毒性试验。为了评估人 iPSC 来源的心肌细胞作为体外促心律失常模型的效用，我们评估了 28 种与低、中、高TdP 风险类别相关的药物浓度依赖性和反应(CiPA 倡议建议的化合物列表)。利用钙敏感染料快速动态荧光法测量细胞内Ca²⁺ 振荡的变化，监测不同化合物对心肌细胞自发活动收缩速率和模式的影响。采用先进的图像分析方法对钙离子振荡模式进行多参数表征



利用新型高速 EMCCD 相机 (FLIPR Penta 系统), 我们使用钙敏感染料测试了不同化合物对细胞内 Ca²⁺ 振荡速率和模式的影响。3a) 利用 FLIPR Penta 系统同时对 384 孔板进行了高通量记录和分析。3b) 在对照和化合物处理的样品中, 有代表性的钙振荡痕迹。细胞染色 2 h, 化合物处理 30 min。观察到模式随浓度的变化。用 FLIPR Penta 系统记录振荡轨迹。通过 ScreenWorks Peak Pro 2 软件进行模式特性分析。化合物刺激轨迹用红色表示, 黑色表示对照信号。



平均峰率、峰间距和峰延长等参数的变化对应的浓度依赖性和EC50值。

神经毒性分析：人 iPSC 来源的神经细胞球 3D

为了加快开发更有效和更安全的药物，越来越需要更复杂、生物学相关和预测细胞为基础的药物发现和毒理学筛选检测方法。人 iPSC 来源的神经三维共培养 (microBrain 3D platform) 已发展成为一种高通量的筛选平台，更接近于人类皮质脑组织的结构。神经细胞球三维共培养是由 iPSC 来源的功能活跃的皮质谷氨酸能神经元和 GABA 能神经元与来自同一供体的星形胶质细胞共分化成熟的一种生理相关的共培养。三维神经球体包含一个突触丰富的神经网络，创造了一个高度功能性的神经回路，并显示自发同步，易于检测的钙振荡。

研究表明，iPSC 来源的三维神经球体检测平台是一种很有前途的生物相关工具，可用于评估药物和环境毒物的神经毒性潜能。

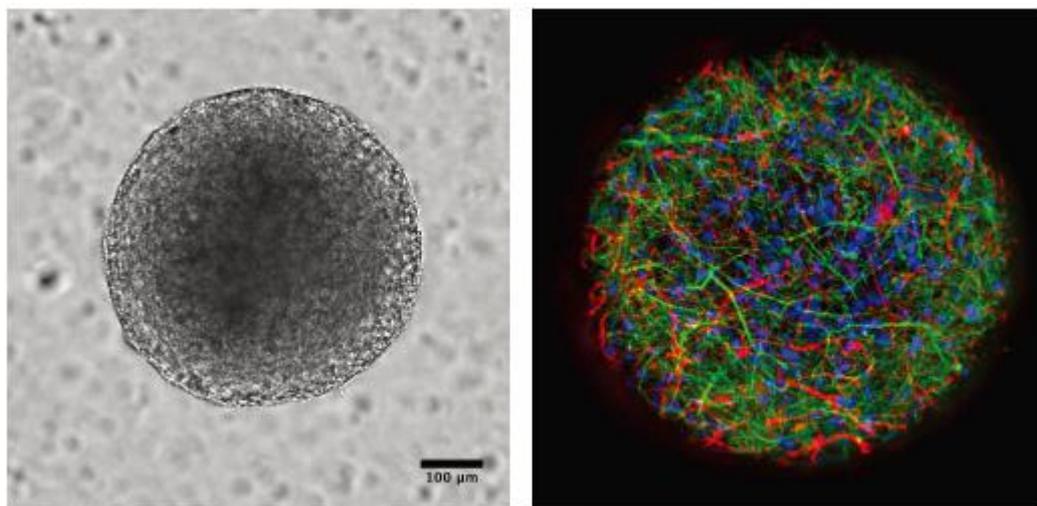


图 1 人 iPSC 来源的神经球体由活跃的大脑神经元 (MAP2 标记, 绿色) 和星形胶质细胞 (GFAP 标记, 红色) 共同培养而成, 大约 600 μm 直径。ImageXpress® Micro 共聚焦高内涵成像系统, 20X magnification。

FLIPR Penta 系统记录的钙振荡信号轨迹:

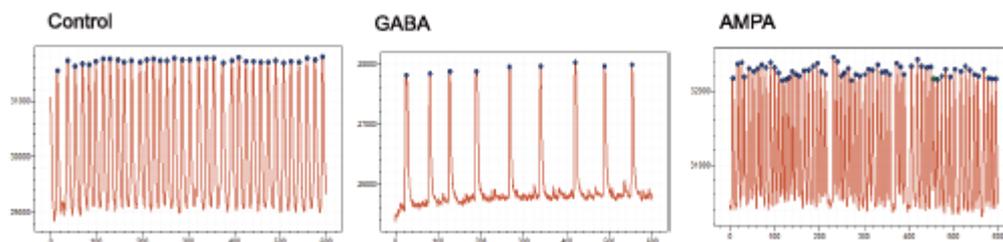


图 2 新的 ScreenWorks Peak Pro 2 软件配备了额外的工具, 可以使用 >20 描述对观察到的表型变化进行峰分析。使用 FLIPR 钙 6 检测试剂盒 (Molecular Devices) 评估细胞内 Ca^{2+} 振荡。

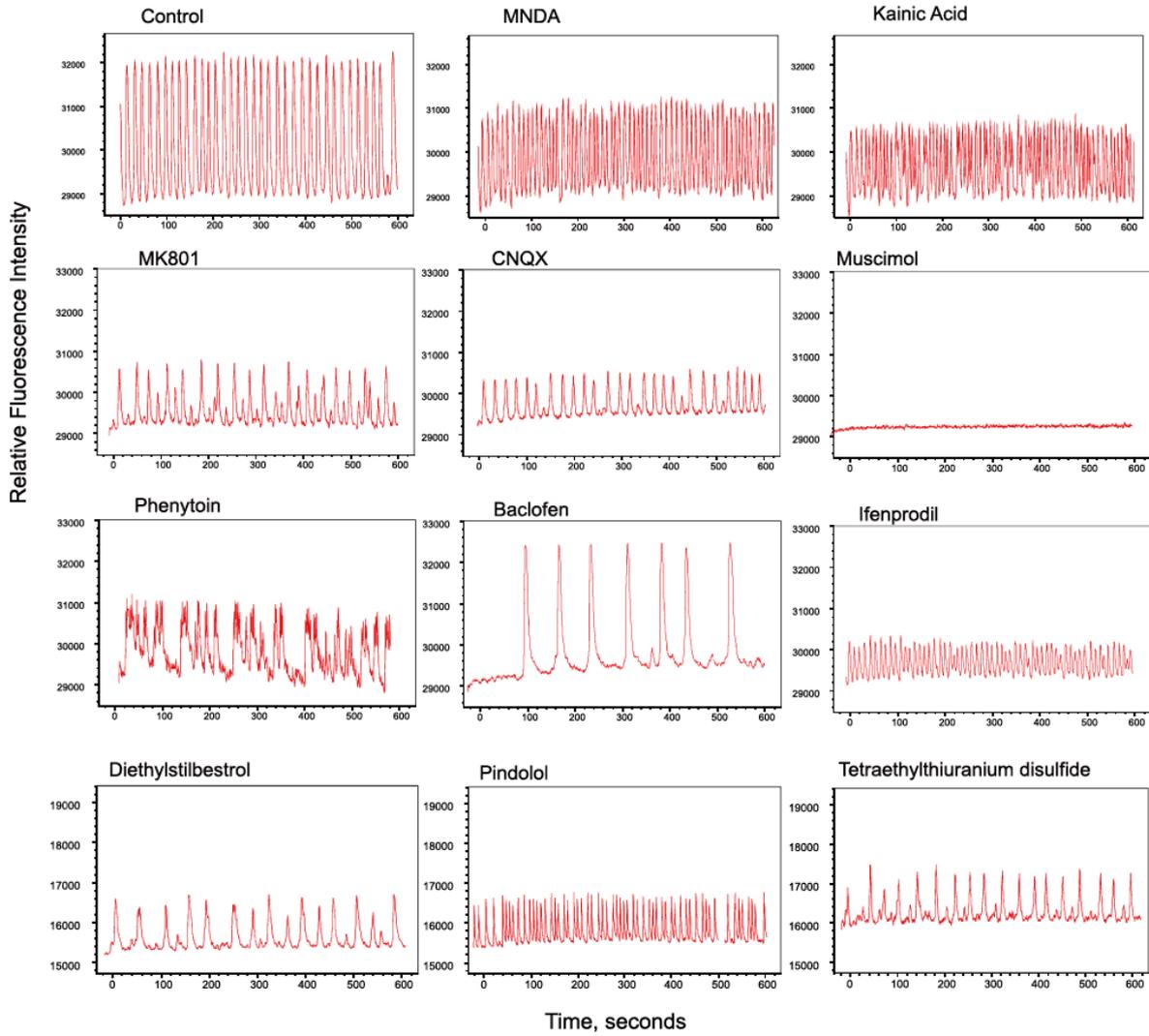


图 3 新的 ScreenWorks Peak Pro 2 软件配备了额外的工具，可以使用 >20 描述对观察到的表型变化进行峰分析。使用 FLIPR 钙 6 检测试剂盒 (Molecular Devices) 评估细胞内 Ca²⁺ 振荡。

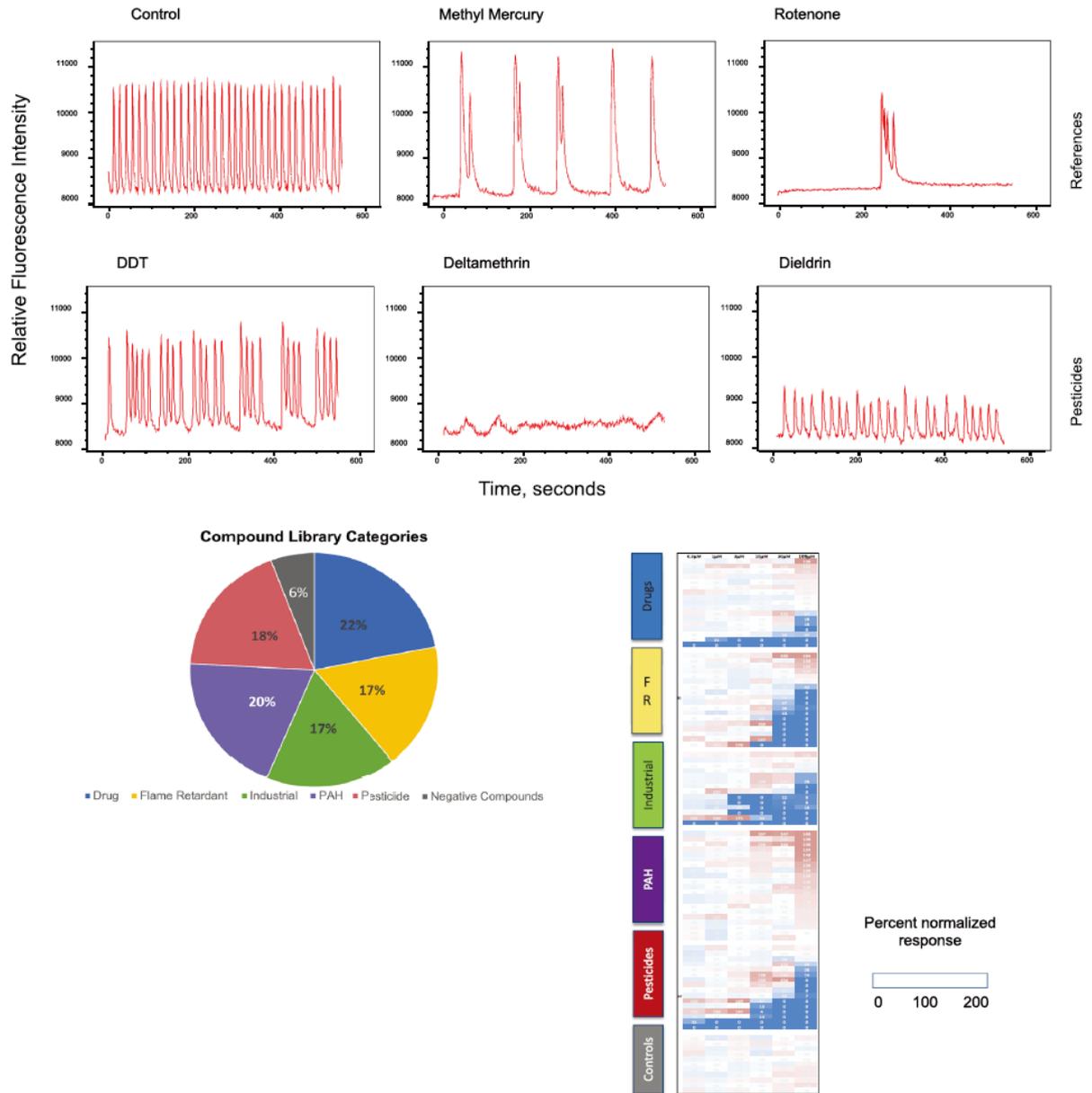


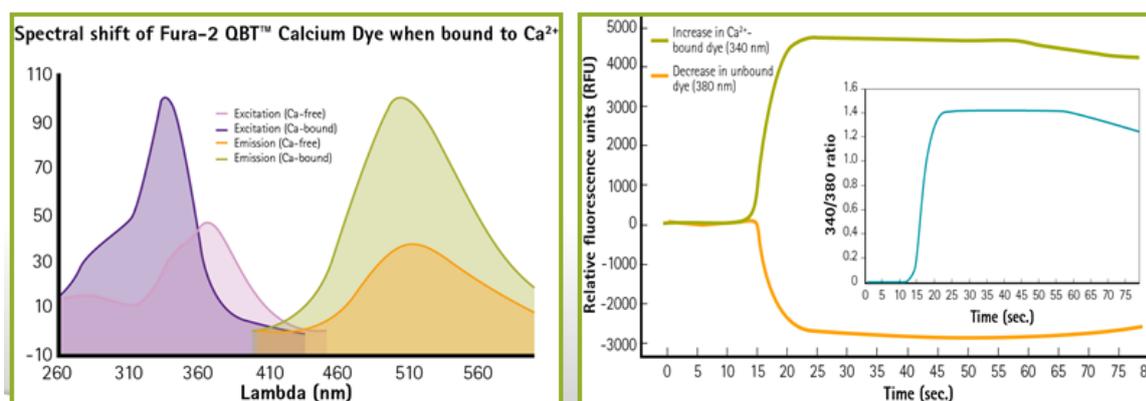
图 4 使用神经毒性化合物处理时振荡频率的变化。用化合物处理球状体 22 h，然后加入钙 6染料处理 2 h。用 FLIPR 系统记录并分析了振荡模式。EC50 值或基准浓度是根据峰值速率或其他测量值的浓度依赖关系计算的。该方法可用于神经毒性化合物的功能和活性筛选。

FLIPR其它应用方向

(1) 更精确、更低干扰、更好信噪比的比例法钙流检测 (Fura-2)

UV Ratiometrics: FURA-2 QBT Calcium Kit

- Ratiometric fluorescent dye which binds to free intracellular calcium in the cell cytoplasm
 - First widely-used dye for calcium imaging, and remains very popular.
 - Excited at 340 nm and 380 nm, emission 510nm.
 - Ratio of emissions – correlates to amount of intracellular calcium.
 - During intracellular Ca²⁺ mobilization, Fura-2 undergoes a spectral shift proportional to intracellular calcium concentration
 - Peak absorbance shifts from 340 nm in the Ca²⁺ bound state (when Fura bound to Ca²⁺) to 380 nm in the Ca²⁺ free state.



(2) Gi 和 Gs 介导的非 Gq 通路 GPCR 功能检测

- Promega GloSensor Gi, Gs, GPCR assay
 - Measurement of increase and decrease in cAMP via luciferase
 - Truly Kinetic
- TANGO
 - Endpoint for B-arrestin GPCRs, but FLIPR Tetra provides high capacity for throughput in 1536 with robot

FLIPR 系统的卓越性能

(1) 多种通量的移液加样头

系统具有 96、384 或 1536 孔三种通量类型的移动加样头可选配

FLIPR 配套自动化液体处理系统——（可升级）

- **整板一次性加样，荧光信号同步一次性被检测**

- **多种通量可选**

- 96
- 384
- 384 pin tool
- 1536
- 1536 pin tool

- **两种通量加样头之间更换简单**

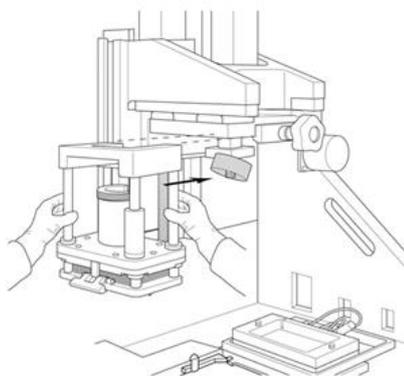
- 无需厂家工程师上门，节省时间

- **支持多种加样方式**

- 单吸-单加、单吸-多加、多吸-单加

- **加样头智能化移动，精度更高**

- 随着体系液面的变化，枪头高度自动升高或降低



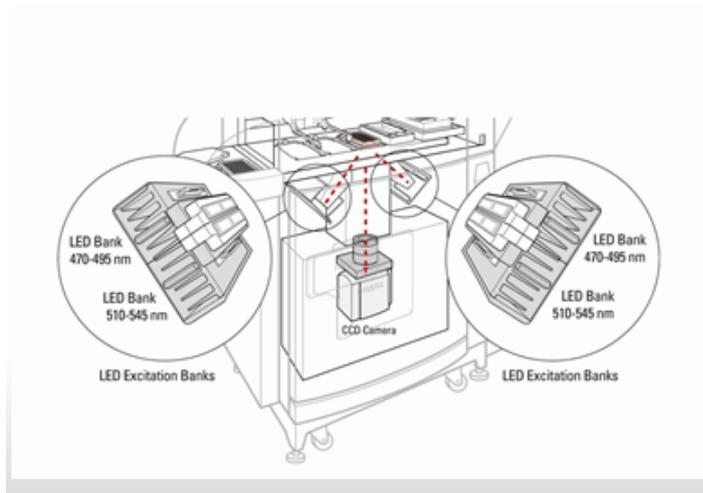
(2) 多种波长的激发光源与滤光镜片

有多种波长（335nm~706nm）的激发光源与滤光镜片可供选择，满足不同类型信号检测的要求

- 钙流检测：LED-- 470-495nm，滤光片-- 515-575nm
- 膜电位检测（可选）：LED-- 510-545nm，滤光片-- 565-625 nm
- 电压敏感探针（可选）：LED-- 390-420nm，滤光片-- 440-480 nm 和 565-625 nm
- 双波长比率测量钙流检测（可选）：LED-- 335-345nm 和 380-390nm，滤光片--475-535 nm
- 其它可选 LED 光源波长：420-455nm，610-626 nm，495-505nm，360-380nm 等
- 其它可选滤光片波长：400-460nm，526-586nm，646-706nm 等

多样化选择——不同波长LED激发光源

- 一次可以配置2个波长的LED激发光源
- 可以同时双波长激发 或者比例式检测实验（如Fura-2）
- 时间分辨率高，更适用于快速检测实验

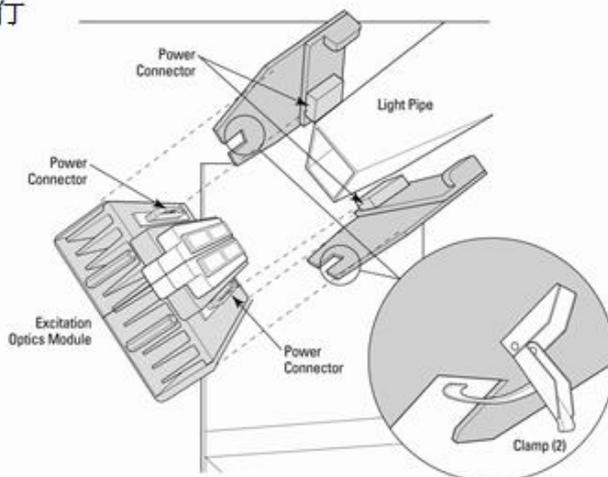


其它同类设备则使用的是上一代光源氙灯（Xenon Lamp）和激发滤片来达到不同波长的激发光，并不是LED。

氙灯的寿命短，平均1000小时左右，每年都需要更换灯泡。LED的寿命则不低于10000小时，如按照每周工作20小时来计算，大约可以使用15年以上。

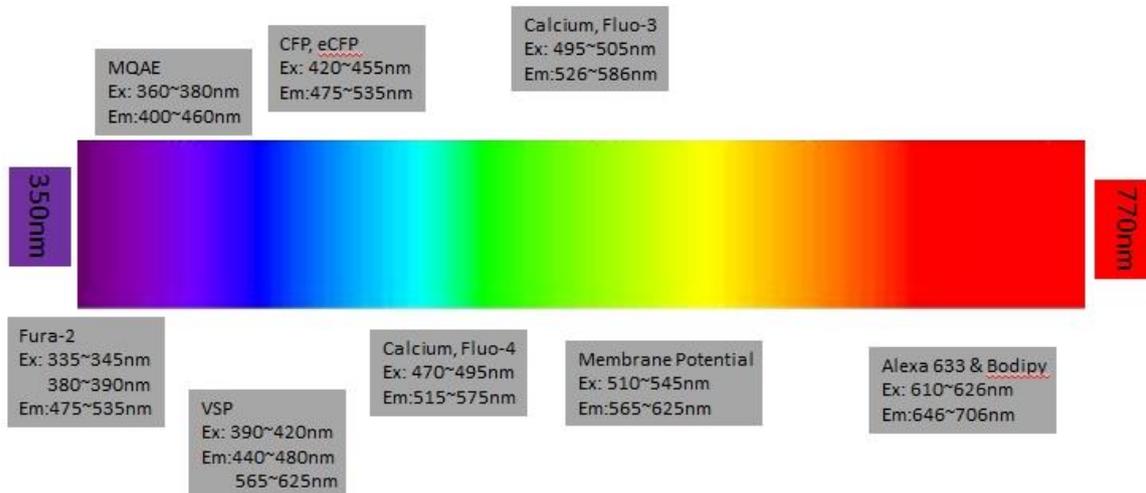
LED 激发光源更换简便

- 用户根据实验需求，可自行更换
 - 十分钟即可完成
 - 无需任何工具



(3) 全波长应用，满足更多实验需求

全波长应用，满足更多实验需求

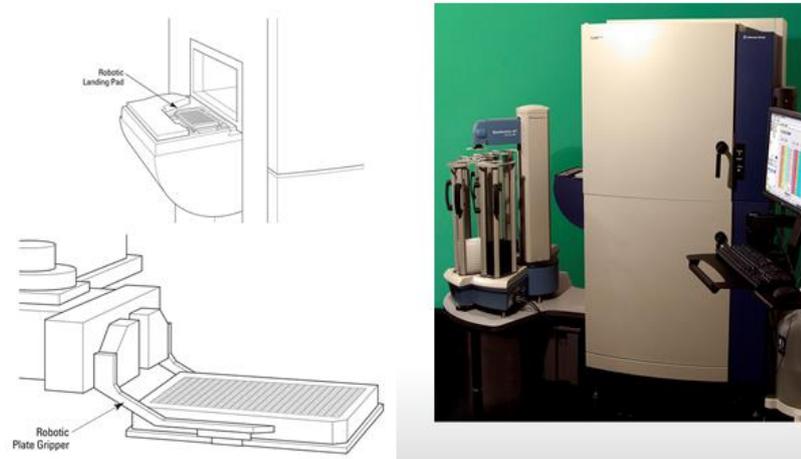


钙流、比例法钙流、氯离子荧光探针、青色荧光蛋白、膜电位、电压敏感探针、金属离子等

(4) 系统具有良好的可扩展性:

- a. 可选配自动化加板模块（包括机械手臂和堆板机），实现长时间、高通量、自动化的筛选工作；
- b. 可选配用于化学发光检测的悬浮细胞培养池，可外接液体循环清洗系统。细胞悬液可直接置于细胞培养池，只需在软件内编辑模板，轻点鼠标，即可进行细胞加样。

卓越的可扩展性



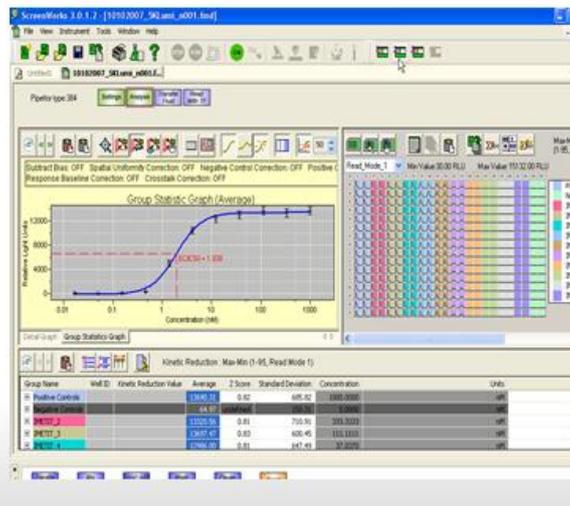
(5) 功能强大、使用方便的软件 ScreenWorks™

FLIPR 的硬件和操作软件 (ScreenWorks) 在功能操控和方案编辑上采用模块化设计, 非常方便使用。本科毕业的技术员经过几天的培训可以快速上机操作, 得到完美数据, 不会产生人为操作误差。对于人员变动不会带来实验运行的中断和不连续性。

另外 FLIPR 的软件可以在实验结束时同步对结果进行统计学分析和曲线拟合, 立即得到 IC/EC₅₀ 值, 标准差、Hill slope 等统计学参数, 可以最快速地给实验者反馈准确的统计结果, 便于第一时间做出验证和判断, 节省时间、提高效率。

功能强大、使用方便的软件 ScreenWorks™

- **人性化设计**
 - 多数功能通过点击按钮直接实现
 - 根据需要更换编辑模式
- **提供多种统计模板**
- **数据显示和分析**
 - 单孔或实验组 全部结果直接显示
 - 激活或抑制 (EC/IC) 曲线轻松拟合
 - 所有数据或图形方便直接复制/粘贴和导出
- **可以离线分析数据**



(6) 配套试剂

- 试剂盒均有具有免洗功能以及干扰信号遮蔽技术, 可增加信噪比。有多种规格可供选择;
- 钙流检测试剂盒;
- 膜电位检测试剂盒;
- 心肌毒性检测试剂盒;
- 双波长比率测量法钙流检测试剂盒;
- Liveware 稳转细胞系和质粒, 耦合 Gi、Gs 等通路的受体, 可间接记录非 Gq 通路的 GPCR 受体信号;
- 可使用第三方厂家生产的试剂盒, 例如 VSP (Invitrogen 公司, 检测膜电位变化), Glosensor (Promega 公司, 检测 Gi 和 Gs 通路信号);

FLIPR 实时荧光检测分析系统技术参数

主要技术参数	指标
1. ※ 主机	<ul style="list-style-type: none"> • 一个枪头洗涤站， 96 通道（与加样头配套）； • 两个液体补给瓶（容积 3 加仑，材料为聚乙烯）； • 两个废液瓶（容积 3 加仑，材料为聚乙烯）； • 仪器内部的实验操作台具有 3 个放置化合物板的位置，一个记录板位置。 • 仪器内部的实验操作台具备温度调节功能，温度控制范围在室温上+5-40 °C； • 主机自带一套用于测细胞内钙离子浓度的光学组件，激发波长 470-495nm，发射波长 515-575nm。 • 用 LED 灯作为光源，使用寿命长。 • 配套原装电脑工作站
2. ※ 激发光源	光源: 发光二极管 (LED) <ul style="list-style-type: none"> • 钙流检测（默认）：470-495nm； • 细胞膜电位检测（可选）：510-545nm； • 电压敏感探针（可选）：LED-- 390-420nm， • 双波长比率测量钙流检测（可选）：LED-- 335-345nm 和 380-390nm， • 其它可选 LED 光源波长：420-455nm，610-626 nm，495-505nm，360-380nm 等
3. ※ 发射光滤片	<ul style="list-style-type: none"> • 钙流检测（默认）：滤光片-- 515-575nm • 膜电位检测（可选）：滤光片-- 565-625 nm • 电压敏感探针（可选）：滤光片-- 440-480 nm 和 565-625 nm • 双波长比率测量钙流检测（可选）：滤光片--475-535 nm • 其它可选滤光片波长：400-460nm，526-586nm，646-706nm 等
4. 荧光信号检测器	标准冷冻型 EMCCD 相机；可选高速 EMCCD（HS EMCCD）
荧光信号敏感度 $Z' \geq 0.5$ (整板)	5nM 荧光素
采样频率	7 Hz （HS EMCCD 采样频率最高可至 100 Hz）
比率测量	每实验最多 4 对激发/发射光
比率测量发射光采样频率	1 Hz (2EX/EM pairs)
5. ※ 系统操作和分析软件	可直接在线进行数据统计分析和曲线拟合，实验结束后可直接得到 EC50/IC50 值和 Z 值，无需导出数据进行二次分析
6. ※ 厂家配套试剂盒	<ul style="list-style-type: none"> • 厂家可优惠提供配套仪器使用的钙流、钾离子通道检测、膜电位检测等试剂盒，多种规格可供选择。试剂盒均有具有免洗功能以及干扰信号遮蔽技术，可增加信噪比。 • 设备同时也可使用第三方厂家生产的试剂盒
7. ※ 液体转移系统	<ul style="list-style-type: none"> • 整板加样，同步检测，可选择 96 道（未来可自主升级更换 384 道和/或 1536 道移液加样头，且使用人员可自行手动更换无需任何工具）。 • 样品添加方式灵活多样，可单吸---单加、单吸---多加、多吸---单加，满足多种实验需求。 • 配套 96 道移液加样头，移液范围不低于 5-200μL，精确度@ 75 μL 的 CV 为 3%，移液器递增量为 1 μL • 移液加样头可进行 Y 轴和 Z 轴移动 • 可自动装载枪头，无需手动操作 • 可实现四分之一液体转移，即 96 道移液头分四次实现 384 孔板加液以及 384 道移液头分四次实现 1536 孔板加液；
8. 系统升级	系统未来可随时升级加配自动化加板模块（包括机械手臂和堆板机）和悬浮细胞装置

近年部分发表文献

1. Cao H, Ouyang H, Laselva O, et al. A helper-dependent adenoviral vector rescues CFTR to wild type functional levels in CF epithelial cells harbouring class I mutations [published online ahead of print, 2020 May 26]. *Eur Respir J.* 2020;2000205. doi:10.1183/13993003.00205-2020
2. Pierce ML, French JA, Murray TF. Comparison of the pharmacological profiles of arginine vasopressin and oxytocin analogs at marmoset, macaque, and human vasopressin 1a receptor. *Biomed Pharmacother.* 2020;126:110060. doi:10.1016/j.biopha.2020.110060
3. Gadgaard C, Jensen AA. Functional characterization of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} serotonin receptor signaling through G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels in a fluorescence-based membrane potential assay. *Biochem Pharmacol.* 2020;175:113870. doi:10.1016/j.bcp.2020.113870
4. Dunn PJ, Salm EJ, Tomita S. ABC transporters control ATP release through cholesterol-dependent volume-regulated anion channel activity. *J Biol Chem.* 2020;295(16):5192-5203. doi:10.1074/jbc.RA119.010699
5. Batista L, Contu R, Van Hese B, Zanella F, Bastogne T. Automated classification of early afterdepolarizations grades in FLIPR calcium assays. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2019;99:106595. doi:10.1016/j.vascn.2019.05.096
6. Sheng N, Zheng H, Li M, et al. 4,5 caffeoylquinic acid and scutellarin, identified by integrated metabolomics and proteomics approach as the active ingredients of Dengzhan Shengmai, act against chronic cerebral hypoperfusion by regulating glutamatergic and GABAergic synapses. *Pharmacol Res.* 2020;152:104636. doi:10.1016/j.phrs.2020.104636
7. Vetter I, Carter D, Bassett J, et al. High-Throughput Fluorescence Assays for Ion Channels and GPCRs. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1131:27-72. doi:10.1007/978-3-030-12457-1_3
8. Santiago M, Sachdev S, Arnold JC, McGregor IS, Connor M. Absence of Entourage: Terpenoids Commonly Found in Cannabis sativa Do Not Modulate the Functional Activity of Δ^9 -THC at Human CB₁ and CB₂ Receptors. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2019;4(3):165-176. Published 2019 Sep 23. doi:10.1089/can.2019.0016
9. Chiang CY, Wu CC, Chen YJ, Liu SJ, Leng CH, Chen HW. Delivery of Antigen to CD8⁺ Dendritic Cells by Fusing Antigen With Formyl Peptide Receptor-Like 1 Inhibitor Protein Induces Antitumor Immunity. *Front Immunol.* 2019;10:1839. Published 2019 Aug 2. doi:10.3389/fimmu.2019.01839
10. Ekins S, Gerlach J, Zorn KM, Antonio BM, Lin Z, Gerlach A. Repurposing Approved Drugs as Inhibitors of Kv7.1 and Nav1.8 to Treat Pitt Hopkins Syndrome. *Pharm Res.* 2019;36(9):137. Published 2019 Jul 22. doi:10.1007/s11095-019-2671-y
11. Faleschini MT, Maier A, Fankhauser S, et al. A FLIPR Assay for Discovery of GABA_A Receptor Modulators of Natural Origin. *Planta Med.* 2019;85(11-12):925-933. doi:10.1055/a-0921-7602
12. Kizner V, Fischer S, Jähnke B, Naujock M. Assessing Neuronal Excitability on a Fluorometric Imaging Plate Reader (FLIPR) Following a Defined Electrostimulation Paradigm. *Methods Mol Biol.* 2019;1994:219-226. doi:10.1007/978-1-4939-9477-9_20
13. Zhou ZP, Yang LL, Cao H, et al. In Vitro Validation of a CRISPR-Mediated CFTR Correction Strategy for Preclinical Translation in Pigs. *Hum Gene Ther.* 2019;30(9):1101-1116. doi:10.1089/hum.2019.074
14. Jin AH, Cristofori-Armstrong B, Rash LD, et al. Novel conorfamides from *Conus austini* venom modulate both nicotinic acetylcholine receptors and acid-sensing ion channels. *Biochem Pharmacol.* 2019;164:342-348. doi:10.1016/j.bcp.2019.04.025

15. Woodward DF, Wang JW, Coleman RA, et al. A Highly Effective and Ultra-Long-Acting Anti-Glaucoma Drug, with a Novel Periorbital Delivery Method. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2019;35(5):265-277. doi:10.1089/jop.2018.0126
16. Lin SY, Kuo YH, Tien YW, et al. The in vivo antinociceptive and μ -opioid receptor activating effects of the combination of N-phenyl-2',4'-dimethyl-4,5'-bi-1,3-thiazol-2-amines and naloxone. *Eur J Med Chem.* 2019;167:312-323. doi:10.1016/j.ejmech.2019.01.063
17. Xia E, Zhang Y, Cao H, Li J, Duan R, Hu J. TALEN-Mediated Gene Targeting for Cystic Fibrosis-Gene Therapy. *Genes (Basel).* 2019;10(1):39. Published 2019 Jan 11. doi:10.3390/genes10010039
18. Danthi SJ, Liang B, Smicker O, et al. Identification and Characterization of Inhibitors of a Neutral Amino Acid Transporter, SLC6A19, Using Two Functional Cell-Based Assays. *SLAS Discov.* 2019;24(2):111-120. doi:10.1177/2472555218794627
19. Wang D, Neupane P, Ragnarsson L, Capon RJ, Lewis RJ. Synthesis of Pseudellone Analogs and Characterization as Novel T-type Calcium Channel Blockers. *Mar Drugs.* 2018;16(12):475. Published 2018 Nov 28. doi:10.3390/md16120475
20. Wu L, Zhang W, Qiu X, et al. Identification of Alkaloids from *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang as Dopamine D₁ Receptor Antagonists by Using CRE-Luciferase Reporter Gene Assay. *Molecules.* 2018;23(10):2585. Published 2018 Oct 10. doi:10.3390/molecules23102585
21. Stevenson RJ, Azimi I, Flanagan JU, Inserra M, Vetter I, Monteith GR, Denny WA. An SAR study of hydroxy-trifluoromethylpyrazolines as inhibitors of Orai1-mediated store operated Ca(2+) entry in MDA-MB-231 breast cancer cells using a convenient Fluorescence Imaging Plate Reader assay. *Bioorg Med Chem.* 2018 Jul 23;26(12):3406-3413. doi: 10.1016/j.bmc.2018.05.012.
22. Sairaman A, Cardoso FC, Bispat A, Lewis RJ, Duggan PJ, Tuck KL. Synthesis and evaluation of aminobenzothiazoles as blockers of N- and T-type calcium channels. *Bioorg Med Chem.* 2018 Jul 15;26(11):3046-3059. doi: 10.1016/j.bmc.2018.03.031. Epub 2018 Mar 19. PubMed PMID: 29622412.
23. Binsker U, Palankar R, Wesche J, Kohler TP, Prucha J, Burchhardt G, Rohde M, Schmidt F, Bröker BM, Mamat U, Pané-Farré J, Graf A, Ebner P, Greinacher A, Hammerschmidt S. Secreted Immunomodulatory Proteins of *Staphylococcus aureus* Activate Platelets and Induce Platelet Aggregation. *Thromb Haemost.* 2018 Apr;118(4):745-757. doi: 10.1055/s-0038-1637735. Epub 2018 Mar 19. PubMed PMID:29554697.
24. Häfner S, Burg F, Kannler M, Urban N, Mayer P, Dietrich A, Trauner D, Broichhagen J, Schaefer M. A (+)-Larixol Congener with High Affinity and Subtype Selectivity toward TRPC6. *ChemMedChem.* 2018 May 23;13(10):1028-1035. doi:10.1002/cmdc.201800021. Epub 2018 Apr 26. PubMed PMID: 29522264.
25. Chen X, Wan J, Yu B, Diao Y, Zhang W. PIP5K1 α promotes myogenic differentiation via AKT activation and calcium release. *Stem Cell Res Ther.* 2018 Feb 9;9(1):33. doi: 10.1186/s13287-018-0770-z. PubMed PMID: 29426367; PubMed Central PMCID: PMC5806439.
26. Streit J, Kleinlogel S. Dynamic all-optical drug screening on cardiac voltage-gated ion channels. *Sci Rep.* 2018 Jan 18;8(1):1153. doi: 10.1038/s41598-018-19412-z. PubMed PMID: 29348631; PubMed Central PMCID:PMC5773578.
27. Larsson ME, Laczka OF, Harwood DT, Lewis RJ, Himaya SWA, Murray SA, Doblin MA. Toxicology of *Gambierdiscus* spp. (Dinophyceae) from Tropical and Temperate Australian Waters. *Mar Drugs.*

- 2018 Jan 1;16(1). pii: E7. doi: 10.3390/md16010007. PubMed PMID: 29301247; PubMed Central PMCID: PMC5793055.
28. Janicki PK, Eyileten C, Ruiz-Velasco V, Sedeek KA, Pordzik J, Czlonkowska A, Kurkowska-Jastrzebska I, Sugino S, Imamura-Kawasawa Y, Mirowska-Guzel D, Postula M. Population-Specific Associations of Deleterious Rare Variants in Coding Region of P2RY1-P2RY12 Purinergic Receptor Genes in Large-Vessel Ischemic Stroke Patients. *Int J Mol Sci.* 2017 Dec 11;18(12). pii: E2678. doi: 10.3390/ijms18122678. PubMed PMID: 29232918; PubMed Central PMCID: PMC5751280.
29. Virdee JK, Saro G, Fouillet A, Findlay J, Ferreira F, Eversden S, O'Neill MJ, Wolak J, Ursu D. A high-throughput model for investigating neuronal function and synaptic transmission in cultured neuronal networks. *Sci Rep.* 2017 Nov 3;7(1):14498. doi: 10.1038/s41598-017-15171-5. PubMed PMID: 29101377; PubMed Central PMCID: PMC5670206.
30. Daily NJ, Santos R, Vecchi J, Kemanli P, Wakatsuki T. Calcium Transient Assays for Compound Screening with Human iPSC-derived Cardiomyocytes: Evaluating New Tools. *J Evol Stem Cell Res.* 2017;1(2):1-11. doi: 10.14302/issn.2574-4372.jesr-16-1395. Epub 2017 Jan 24. PubMed PMID: 28966998; PubMed Central PMCID: PMC5621642.
31. Shelukhina I, Spirova E, Kudryavtsev D, Ojomoko L, Werner M, Methfessel C, Hollmann M, Tsetlin V. Calcium imaging with genetically encoded sensor Case12: Facile analysis of $\alpha 7/\alpha 9$ nAChR mutants. *PLoS One.* 2017 Aug 10;12(8):e0181936. doi: 10.1371/journal.pone.0181936. eCollection 2017. PubMed PMID: 28797116; PubMed Central PMCID: PMC5552293.
32. Agus V, Picardi P, Redaelli L, Scarabottolo L, Lohmer S. Three-Dimensional Control of Ion Channel Function through Optogenetics and Co-Culture. *SLAS Discov.* 2018 Jan;23(1):102-108. doi: 10.1177/2472555217722990. Epub 2017 Aug 7. PubMed PMID: 28783478.
33. Daily NJ, Du ZW, Wakatsuki T. High-Throughput Phenotyping of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes and Neurons Using Electric Field Stimulation and High-Speed Fluorescence Imaging. *Assay Drug Dev Technol.* 2017 May/Jun;15(4):178-188. doi: 10.1089/adt.2017.781. Epub 2017 May 19. PubMed PMID: 28525289; PubMed Central PMCID: PMC5510053.
34. Katte TA, Reekie TA, Werry EL, Jorgensen WT, Boyd R, Wong ECN, Gulliver DW, Connor M, Kassiou M. Investigation of pyrazolo-sulfonamides as putative small molecule oxytocin receptor agonists. *Eur J Med Chem.* 2017 Aug 18;136:330-333. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.05.013. Epub 2017 May 4. PubMed PMID: 28505537.
35. Barnych B, Vasylieva N, Joseph T, Hulsizer S, Nguyen HM, Cajka T, Pessah I, Wulff H, Gee SJ, Hammock BD. Development of Tetramethylenedisulfotetramine (TETS) Hapten Library: Synthesis, Electrophysiological Studies, and Immune Response in Rabbits. *Chemistry.* 2017 Jun 22;23(35):8466-8472. doi: 10.1002/chem.201700783. Epub 2017 May 30. PubMed PMID: 28411375; PubMed Central PMCID: PMC5808876.
36. Geiss AF, Bliem C, Frank P, Reiner-Rozman C, Kewney J, Boersch M, Naumann RLC. Proteo-lipobeads to encapsulate cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *J Colloid Interface Sci.* 2017 Aug 15;500:119-125. doi: 10.1016/j.jcis.2017.04.009. Epub 2017 Apr 5. PubMed PMID: 28407595.
37. Tomasini A, Moreau K, Chicher J, Geissmann T, Vandenesch F, Romby P, Marzi S, Caldelari I. The

- RNA targetome of *Staphylococcus aureus* non-coding RNA RsaA: impact on cell surface properties and defense mechanisms. *Nucleic Acids Res.* 2017 Jun 20;45(11):6746-6760. doi: 10.1093/nar/gkx219. PubMed PMID: 28379505; PubMed Central PMCID: PMC5499838.
38. Menegon A, Pitassi S, Mazzocchi N, Redaelli L, Rizzetto R, Rolland JF, Poli C, Imberti M, Lanati A, Grohovaz F. A new electro-optical approach for conductance measurement: an assay for the study of drugs acting on ligand-gated ion channels. *Sci Rep.* 2017 Mar 21;7:44843. doi: 10.1038/srep44843. PubMed PMID: 28322303; PubMed Central PMCID: PMC5359596.
39. Falk-Petersen CB, Sogaard R, Madsen KL, Klein AB, Frølund B, Wellendorph P. Development of a Robust Mammalian Cell-based Assay for Studying Recombinant $\alpha(4) \beta(1/3) \delta$ GABA(A) Receptor Subtypes. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2017 Aug;121(2):119-129. doi: 10.1111/bcpt.12778. Epub 2017 May 25. PubMed PMID: 28299900.
40. Pevarello P, Bovolenta S, Tarroni P, Za L, Severi E, Torino D, Vitalone R. P2X7 antagonists for CNS indications: recent patent disclosures. *Pharm Pat Anal.* 2017 Mar;6(2):61-76. doi: 10.4155/ppa-2016-0044. Epub 2017 Mar 1. Review. PubMed PMID: 28248151.
41. Pereira CA, Rodrigues FL, Ruginsk SG, Zanotto CZ, Rodrigues JA, Duarte DA, Costa-Neto CM, Resstel LB, Carneiro FS, Tostes RC. Chronic treatment with fluoxetine modulates vascular adrenergic responses by inhibition of pre- and post-synaptic mechanisms. *Eur J Pharmacol.* 2017 Apr 5;800:70-80. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.02.029. Epub 2017 Feb 17. PubMed PMID: 28216049.
42. Schmunk G, Nguyen RL, Ferguson DL, Kumar K, Parker I, Gargus JJ. High-throughput screen detects calcium signaling dysfunction in typical sporadic autism spectrum disorder. *Sci Rep.* 2017 Feb 1;7:40740. doi: 10.1038/srep40740. PubMed PMID: 28145469; PubMed Central PMCID: PMC5286408.
43. Grimm FA, Iwata Y, Sirenko O, Chappell GA, Wright FA, Reif DM, Braisted J, Gerhold DL, Yeakley JM, Shepard P, Seligmann B, Roy T, Boogaard PJ, Ketelslegers HB, Rohde AM, Rusyn I. A chemical-biological similarity-based grouping of complex substances as a prototype approach for evaluating chemical alternatives. *Green Chem.* 2016 Aug 21;18(16):4407-4419. doi: 10.1039/c6gc01147k. Epub 2016 May 16. PubMed PMID: 28035192; PubMed Central PMCID: PMC5179981.
44. Fermini B, Ramirez DS, Sun S, Bassyouni A, Hemkens M, Wisialowski T, Jenkinson S. L-type calcium channel antagonism - Translation from in vitro to in vivo. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2017 Mar - Apr;84:86-92. doi:10.1016/j.vascn.2016.11.002. Epub 2016 Nov 15. PubMed PMID: 27856310.
45. Azimi I, Flanagan JU, Stevenson RJ, Inserra M, Vetter I, Monteith GR, Denny WA. Evaluation of known and novel inhibitors of Orai1-mediated store operated $Ca(2+)$ entry in MDA-MB-231 breast cancer cells using a Fluorescence Imaging Plate Reader assay. *Bioorg Med Chem.* 2017 Jan 1;25(1):440-449. doi:10.1016/j.bmc.2016.11.007. Epub 2016 Nov 7. PubMed PMID: 27856238.
46. Ghasemzadeh-Moghaddam H, van Wamel W, van Belkum A, Hamat RA, Neela VK. Differences in humoral immune response between patients with or without nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017 Mar;36(3):451-458. doi: 10.1007/s10096-016-2817-3. Epub 2016 Nov 4. PubMed PMID: 27815779.