

BMG Reader高效率 掃描400種藥品 成功實現三項蚊媒檢驗 於單一孔洞中

瘧疾 (Malaria) 是一種熱帶疾病，由瘧原蟲屬 (Plasmodium) 的原生動物寄生蟲感染引起的疾病。每年約有100萬人死亡與瘧疾相關，因此研究抗瘧疾藥物具有高度研究價值。金屬氨基勝肽酶 (Metalloaminopeptidases) M1, M17及M18與瘧疾感染具有高度關聯性，三者皆為鋅蛋白水解酶 (Zinc exopeptidases)，可經由催化作用將蛋白質N端的單一胺基酸進行剪切，對於寄生蟲為必要生存手段，有助於其利用宿主的血紅素 (Hemoglobin)。開發蛋白酶抑制藥物可做為有效的瘧疾治療策略。

瘧疾藥物研究基金會 (Medicines for Malaria Venture, MMV) 提供一個藥物資料庫MMV400作為研究團隊使用。這些藥物以抗瘧疾聞名，但其分子標靶 (Molecular targets) 尚未明瞭。本研究中於單一檢驗系統中，比較400種藥物對應一種或多種金屬氨基勝肽酶 (Metalloaminopeptidases) M1, M17, M18進行藥物篩選。

檢驗原理

為了避免珍貴的藥物浪費，開發出高通量、有效將藥物進行初步篩選的方法。由於三種金屬氨肽酶使用不同受質 (Substrates)，因此可將三者混合針對400種藥物其中一種進行篩選。在先前的實驗中已驗證，三種檢驗可共用一種緩衝溶液，且三種蛋白活性不會互相干擾。

螢光檢測：M1及M17在剪切甲基香豆素基質 (Methylcoumarin) 時，在吸收於355 nm激發光 (Excitation) 並產生460 nm 散射光 (Emission)。

吸收光檢測：M18在裂解鄰硝基苯胺 (Nitroanilide) 時可於405nm偵測吸收光訊號。使用BMG全功能緊湊型多模式盤式判讀儀 (BMG Labtech VANTAstar™)，可以隨時準確偵測吸光值和螢光的變化。所有數據可在測量後可以使用MARS分析軟體進行分析。MARS一鍵分析功能模組可大幅度簡化數據處理並可選擇客製化分析條件。

材料方法

- BMG 全功能緊湊型多模式盤式判讀儀 (BMG Labtech VANTAstar™)
- NUNC的96孔洞透明盤
- 抗瘧疾藥物庫 (MMV400)
- L-Leucine-7-amido-4-methylcoumarin-HCl (Sigma)
- L-Glutamic acid p-nitroanilide (Sigma)

在先前的實驗已證明，三種檢驗可共用一種緩衝溶液，且這三種蛋白酶活性不會互相干擾。最終實驗濃度及體積已被調整為最適合的條件，測定體積為200 μL ，其中1 mM 的藥物溶解於20 μL 100% DMSO 當中。

MMV400藥品庫包括五個96孔盤，其中涵蓋400個藥物，第1列和第12列為空。其中16個孔洞作為控制組使用，當中12個孔洞對照組，分別加入三種蛋白酶 (PotP) 及受質 (PotS)，未加入任何藥物。其中三個孔洞對照組以其中一個蛋白酶 M1或 M17或 M18與受質混合物 (Subtrate mix) 組成，剩餘的孔洞則包含蛋白酶 (PotP)、受質 (PotS) 及抑制劑 (PotI) 由配製而成。蛋白酶 (PotP) 及受質 (PotS) 原液皆為新鮮配備。

吸液順序：

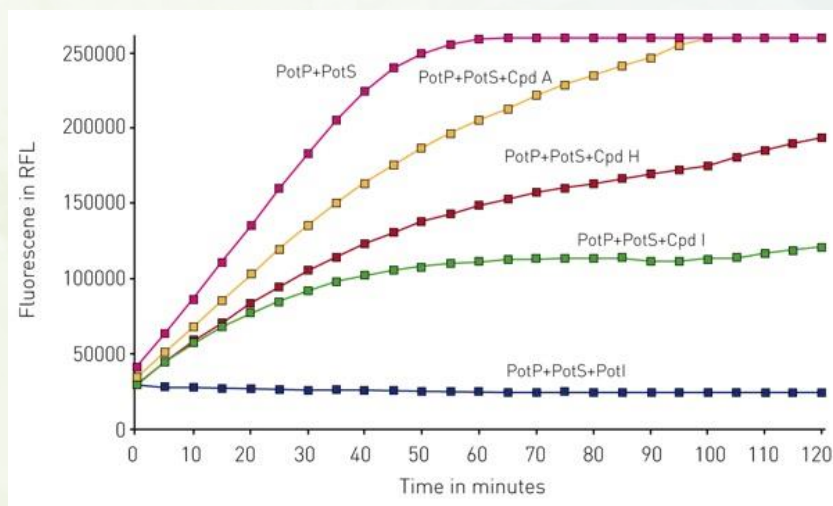
1. 將 DMSO 和 PotI 加入孔洞中。
2. 使用八爪移液管在所有孔洞中各加入80 μL 緩衝液。
3. 在室溫下靜置5分鐘。
4. 將單一蛋白質 (50 μL) 加入3個對照孔洞中，將 PotP (50 μL) 加入所有剩餘的孔洞中。
5. 在37°C下蓋上蓋子培養 (Incubate) 10分鐘。
6. 使用八爪移液管在所有孔洞中加入 PotS (50 μL)。
7. 在預熱37°C的 ELISA reader 上讀取測定結果。

儀器設定

- 偵測選項：螢光及吸收光
- 讀取模式：盤式動力學法
- 週期數：25
- 每個週期時間：300 秒

光學設定

- M1/M17偵測：Ex355/Em460
- M18偵測：405



由圖片顯示在沒有藥物的陽性控制組 (PotP+PotS) 在整個試驗中如預期具有最高的螢光訊號。陰性控制組 (PotP+PotS+PotI) 在整個實驗中螢光訊號都沒有增加。藥物篩選的實驗組可藉由陽性控制組及陰性控制組每分鐘的線性曲線進行比較。隨著時間的增加，螢光增加的遞減表示該藥品抑制活性越高[圖1]。其中25個藥物被認為可有效抑制 M1或 M17[圖2]。

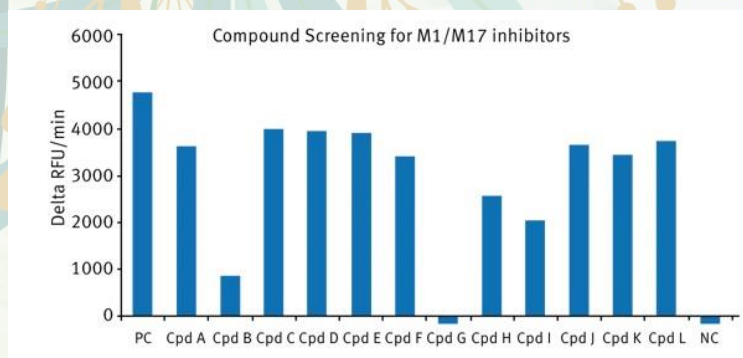


圖 2：M1/M17蛋白酶以螢光分析藥物篩選結果

藉由次級篩選，進一步確認以 M1/M17作為標靶的藥物，僅有兩種藥物在次級篩選中沒有抑制效果，因此在 Pot 分析 (Pot Assay) 中有80%能夠成功抑制 M1或 M17活性。

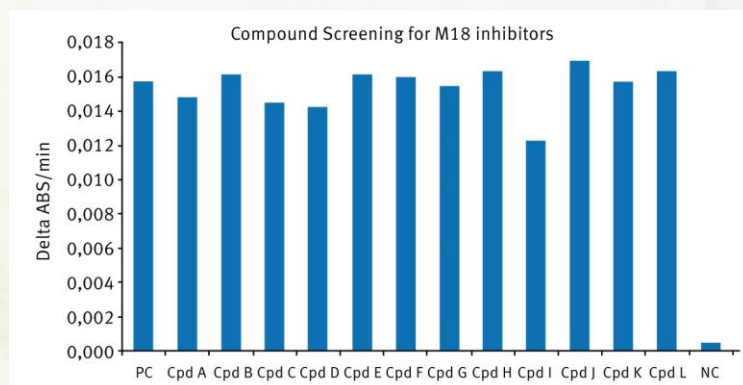


圖 3：以吸收光篩選M18抑制藥物篩選結果

一部分的結果在圖二呈現，M18蛋白酶篩選中沒有找到抑制藥物[圖3]。因 M18具有高度特異性，且僅有400種藥物不算是一個巨大的藥品庫，因此未篩選出有效藥物結果並不意外。藉由BMG全功能緊湊型多模式盤式判讀儀 (BMG Labtech VANTastar™) 幫助，能夠有效建立一個於金屬氨基胜肽酶 M1、M17及 M18有效的篩選方式，通過儀器本身實時偵測吸收光或螢光，可以在一個孔洞當中進行三種檢驗，從而減少藥物的使用量，採用這種方法能讓實驗室效益最大化，於一天內篩選400種藥物。

原廠文章：

[Sheena McGowan et al. Three assays in one well : antimalarial compound library screening \(2013\)](#)