mosquito[®]LV

实验的"好伙伴"

引言

在成功地进行DNA编码化合物库(DEL)筛选后,采取一种高通量检测方法来验证阳性化合物是至关重要的。在384微孔板中一次进行16个化合物的超微量梯度稀释,可以极大地加速Hit 的发现过程,同时提高筛选的准确性和效率。SPT Labtech 研发的 mosquito® LV 显著地改进了我们从 DELcore 和 DELflex 中合成非DNA编码化合物的方法。该仪器可以精准地复制我们的化合物稀释板,增强了我们对实验结

果的信心。此外,由于 mosquito® LV 能够处 理纳升级的样本体积, 使得我们可以对反应体 系进行微缩化以减少昂 贵试剂的使用,从而最 终降低实验的成本。

mosquito® LV 和 assay plate 创建

mosquito® LV 是一台基于固相置换原理的纳升级移液工作站。

mosquito® LV 移液范围是 25 nL-1.2 μL,整个移液范围内的平均误差不到 3%,并且能够在5%的平均CV值下保持高精度移液。仪器兼容96、384、1536孔板,能够在2分钟内完成96孔板的铺板,3分钟内完成384孔板的复制,5分钟内完成四块384孔板

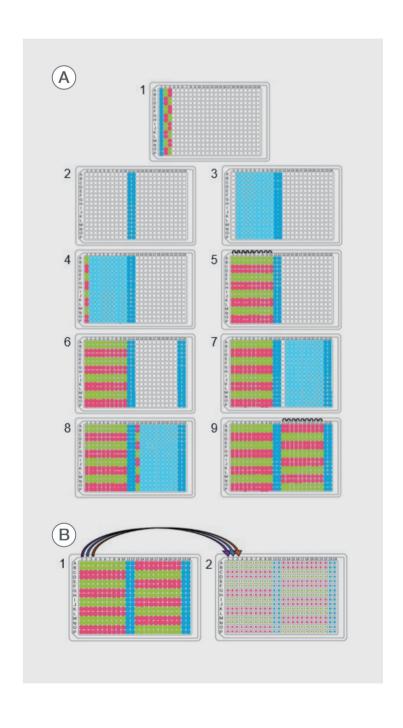






mosquito® LV 使科学家能够灵活地在96、384和1536孔板中进行实验,X-Chem公司发现384孔板是最适合他们进行化合物筛选的形式。

mosquito® LV 可以快速精准地完成 384 孔体系下的样本梯度稀释工作,首先,需要人工完成一块 384 孔母板的制备,即在第一列整列加入 70 μL DMSO,第二列和第三列加入待稀释的化合物(每孔 10 μL)。化合物母板以10000 rpm/min 的转速离心1分钟后,放置到 mosquito 的第一个板位上。随后,在第二个板位上放置另一块384 孔板作为子板,并运行设置好的梯度稀释程序。



mosquito 会从母板的第一列吸取1µL DMSO依次加液到子板的第2-12列,完 成 DMSO 稀释液的添加操作;自动更换枪 头后, mosquito会从母板第二列取 1 µL 的化合物到子板的第一列,再从子板的 第一列移取 0.5 µL 的化合物到第二列, 在 1.5µL总体系吹打混匀五次; 自动更换枪 头后,再从第二列移取0.5 µL化合物到第 三列吹打混匀; 再次更换枪头, 重复这样 的操作至第10列,即mosquito能实现在 1.5µL反应体系里, 完成化合物的三倍梯 度稀释。母板的第三列化合物按同样的方 式在子板的13-24列完成梯度稀释。制 备好的子板以 10000 rpm/min 的转速离 心1分钟后,通过mosquito的复制程序将 子板里的化合物转移到一块新的384孔反 应板中,每孔的移液体积仅为0.1 µL。由 于每列化合物不同, mosquito 可以自动 更换枪头, 仪器可以同时一次性完成4块 子板的复制工作, 最终处理好的化合物稀 释板可以再次离心后用于后续的筛选实验。

► Figure 2.

Serial Dilution Protocol Steps (A) and Spotting Protocol Steps (B)

案例分享: HAO1

mosquito °LV 发布至今,已被广泛应用于HTS和大量的方法学开发中。

该项实验的目的是找到羟基酸氧化酶1 (HAO1)的抑制剂, HAO1 参与乙醛酸的代谢途径,是原发性高草酸尿症(一种以 草酸盐堆积为特征的疾病)的关键靶点(1)。当乙醛酸及其代 谢产物草酸盐的代谢水平过量增加时将导致高草酸尿症。过量 的草酸盐还可以与钙结合,在肾和其它器官中形成草酸钙沉 积,进一步形成肾结石和膀胱结石(尿石症)并导致肾损伤。

在使用mosquito进行化合物筛选之前,对HAO1蛋白和非目标蛋白乳酸脱氢酶B (LDHB)进行了动态光散射 (DLS)、凝胶色谱 (SEC),和熔化性温度 (Melting temperature)等评估,以确定它们是否适合用于 DEL 选择。接下来,通过多种条件 (如:无靶标对照、高浓度和低浓度 HAO1、非靶标以及使用已知HAO1 抑制剂与蛋白质结合的竞争)来进行亲和介导的 DNA编码文库筛选工作。然后对筛选出来的阳性结果进行分析,挑选出活性靠前的阳性化合物,将其合成为非DNA编码化合物 (off-DNA synthesis)后,进一步实验验证这些化合物的活性。

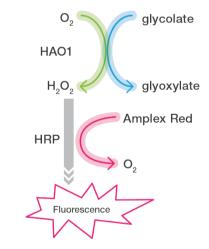


Figure 3. HAO1 HRP Activity Assay Schematic

用于评估这些非DNA编码化合物 (off-DNA synthesis) 的功能学实验是一种基于荧光的检测方法,其通过辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联反应来检测产物中的过氧化氢以确定对 HAO1 靶点的抑制活性 (如图 3所示)。将对 HAO1 靶点有抑制作用的化合物再进行 HRP 干扰实验 (阴性对照分析),该实验与上述实验类似,但不添加 HAO1 蛋白,以验证活性化合物是特异性针对 HAO1 靶点。

使用mosquito® LV移液工作站,按照上文中提到的梯度稀释方法处理化合物后开展筛选,得到最有效的化合物是化合物3、化合物4、化合物5 和化合物6(1)。其中,化合物3的 IC50为 107 nM(如图4A所示);化合物4活性较弱,其IC50为561 nM;

而化合物 5 和化合物6 活性较好,IC50 分别为 48 nM 和 21 nM (如图4A所示)。每个化合物的复孔数据都有很好的重复性,且误差较小,这充分证明了 mosquito® LV 在高效开展HTS的同时,保证了每个化合物复孔结果的一致性,也体现了mosquito® LV 固相置换技术的优势。

(A)

Compound	HAO1 IC ₅₀ (nM)	Standard Deviation	Replicates (n)
3	107	0.044	>150
4	561	0.024	>1
5	48	0.015	>100
6	21	0.006	>30

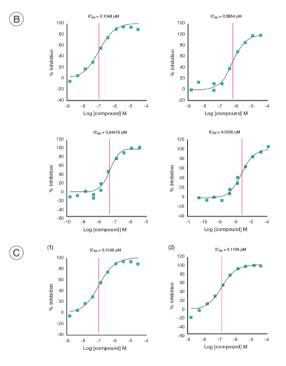


Figure 4. Assay results of the most potent first pass HAO1 compounds (A). Replicate assay results of compound 3 (B). Assay results from July (1) and March (2) of compound 3 (C).

在筛选中,除了对每个化合物设置复孔,同时还需要用已知活性的阳性化合物作为对照,以保证多次筛选结果的可靠性和重复性。在图 4C 中,两次实验得到的化合物 IC50没有显著差异。第一次实验在 2019年7月开展,当时室外温度为 25 $^{\circ}$ C,平均露点为63.07 (2)。第二次实验是在 2020年3月开展,当时室外温度为 5 $^{\circ}$ C,平均露点为27.08 (3)。这展示了 mosquito $^{\circ}$ LV 仪器的超微量移液在不同时间、温度和湿度条件下的可靠性和可重复性。

总体而言,该项目涉及300多个HAO1 HRP活性实验。如果采用传统的化合物稀释方法,这个项目可能需要一年多时间才能完成。然而,使用mosquito®LV不仅可以微缩化反应体系,还可以快速制备实验板,从而使我们的科学家在9个多月时间内完成了330个项目的化合物活性评估工作。

结论

这个研究案例展示了mosquito® LV 在 HTS 中制备实验板的优势,包括通过微缩化反应体系来减少昂贵试剂的用量,降低实验成本。mosquito® LV 的高通量液体处理能力使科学家可以在 X-Chem 的DNA编码化合物库中筛选到大量的Hit,也再次验证了mosquito® LV 在不同时间和环境等条件下的高效、可靠和可重复性。

mosquito® LV 优势:

- 小体积移液也具有很好的精密度和可靠的重复性;
- 移液误差 < 5%;
- 在超微量移液时,亦不受温度和湿度等外部环境 因素的干扰;
- 最多5个板位配置,兼容96、384和1536孔板;
- 易于使用的软件, 可以轻松地创建和执行protocol。



参考文献

- (1) Lee, E. J.; McRiner, A. J.; Georgiadis, K. E.; Liu, J. C.; Wang, Z.; Ferguson, A. L.; Levin, B.; Moritz von Rechenberg; Hupp, C. D.; Monteiro, M. J.; Keefe, A. D.; Olszewski, A.; Eyermann, C. J.; Centrella, P. A.; Liu, Y.; Arora, S.; Cuozzo, J. W.; Zhang, Y.; Clark, M. M.; Huguet, C. Discovery of Novel, Potent Inhibitors of Hydroxy Acid Oxidase 1 (HAO1) Using DNA-Encoded Chemical LibraryScreening. 2021, 64(10), 6730-6744. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c02271.
- (2) Waltham July 2019 Historical Weather Data (Massachusetts, United States) - Weather Spark. Weatherspark.com. https://weatherspark. com/h/m/26310/2019/7/Historical-Weather-in-July-2019-in-Waltham-Massachusetts-United-States#Figures-Temperature (accessed 2023- 07-14).
- (3) Waltham March 2020 Historical Weather Data (Massachusetts, United States) - Weather Spark. Weatherspark.com. https://weatherspark. com/h/m/26310/2020/3/Historical-Weather-in-March-2020-in-Waltham-Massachusetts-United-States (accessed 2023-07-14).

关于X-Chem

我们拥有100多个化合物库,其中包含多达2,500亿个 DNA编码化合物,同时我们拥有大量新颖的小分子化合物,这一强大的资源使您能够在潜力巨大的化合物库内开展筛选工作,成功发现 Hit 的机率高达80%。我们为客户和合作伙伴提供卓越的服务,迄今为止,我们已经授权了100多个药物发现项目,涵盖了300多个无关联的化合物结构类型和1000多个经过验证的hit。

X-Chem的强大技术在30多个靶点的实验项目中得到了验证。这些靶点如蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)、细菌靶标、泛素连接酶、表观遗传靶标和G蛋白偶联受体(GPCR)等都极具有挑战性。无论您是一位正在寻找新靶点筛选的研究人员,还是DEL从业者,我们都将帮助您以最佳的方式利用我们的平台、技术和专业知识,通过将我们革命性的人工智能(AI)、DNA编码化合物库(DEL)和药物化学相结合,更快地发现更多的hit,并转化成候选药物。





