

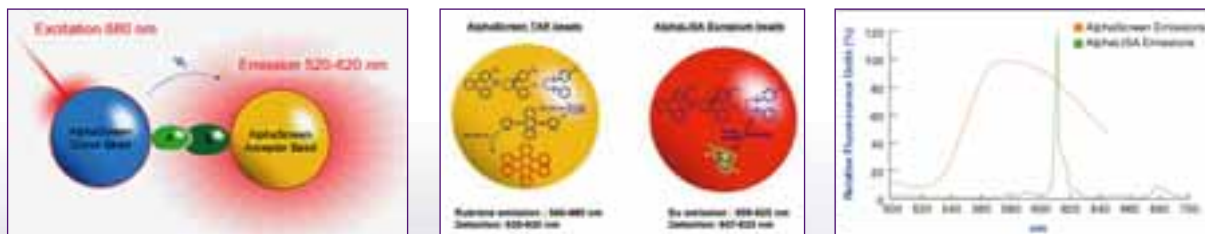
解讀AlphaScreen® / AlphaLISA® 之奧秘

撰文：王坤亮

AlphaScreen® assay 是由PerkinElmer Inc.所發展的實驗技術，應用廣泛且擁有眾多優點，更優化藥物篩檢試驗的效果。其操作硬體之限制，導致這實驗方法雖然已研發數年，大多數研究人員並未知曉或廣泛應用它。然而隨者科技進步，BioTekInc.(USA)解決硬體上昂貴限制，同時讓客戶有更多選擇及應用方向，在此為大家解析相關原理及發展，希望此文章可以讓研究人員了解更多。

先介紹AlphaScreen原理(如下圖示)，AlphaScreen® 其實是一種Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay，主要含有兩種Beads，一為Donor另一為Acceptor，當Donor Bead所帶有的A分子與Acceptor Bead所帶有的B分子距離非常接近時，可以使用680 nm激發光去引發其表面所帶有的光敏感物質(Photosensitizer)，使其催化周遭的氧分子形成活化態，產生效率可達每秒60000個氧分子活化態產生，藉此將訊號放大，此活化態氧分子再與鄰近的Acceptor Bead上之thioxene compounds產生化學冷光反應，產生冷光效應(波長大約為370nm)，此冷光並進一步藉由能量轉換激發讓Acceptor Bead產生520-620 nm的發散光螢光訊號，由於氧分子活化態非常不穩定，此反應相當快速僅4us，加上若此二種Beads距離超過200nm，反應隨之下降，意味所有反應勢必為AB分子結合所導致。在實際應用上，AlphaScreen assay目前有針對GPCR藥物篩選、激酶分析試驗(Kinase Assay)、蛋白質交互作用(Protein-Protein interaction)提供相關試劑組。

由於AlphaScreen®原理上，為了可以激發出大量的氧分子活化態，原本PE Enspire傳統設計使用雷射作為激發光源，也讓其儀器購置成本上，大幅提升許多。且由於使用雷射作為激發光源，也導致客戶無法操作其他常見之偵測方式，例如：吸收光、螢光及冷光等等相關盤式實驗。2010年BioTekInc.(USA)發表Synergy Alpha系列機種，不僅解決光源強度的問題，也讓客戶同時可以操作其他盤式應用實驗。



研發至今Alpha 技術已發展應用於更多方向，進一步更發展AlphaLISA® 出來。原理上大同小異，主要差異在Acceptor bead，分別為：

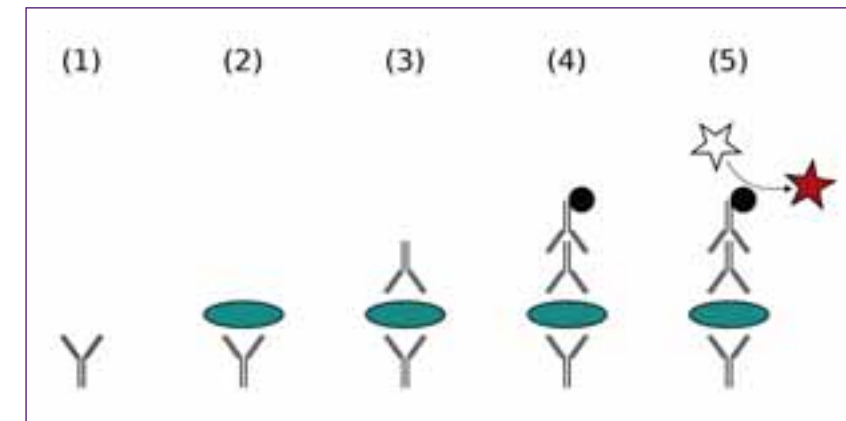
(1) AlphaScreen®：發散波長為520-620 nm；

(2) AlphaLISA®：發散波長為 615 nm。就圖譜上，似乎AlphaLISA® 有較AlphaScreen® 較為集中之趨勢。

而AlphaLISA® 就字面表面上可能會給許多人一個錯覺，是不是一個ELISA實驗？所以是不是以吸收光方式偵測？其實它是一個ELISA + Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay才是。它由於是類螢光方式，所以靈敏度及偵測範圍相較於傳統ELISA(吸收光)方式均為來得靈敏及廣泛，操作上也有一些讓客戶可以很方便的地方，例如樣本，所有ELISA適用檢體均可以應用，包括Serum、culture medium及Plasma等。故在一些實驗需求上較為要求之狀況可以被應用，如藥物篩檢或是微弱訊號偵測等等。

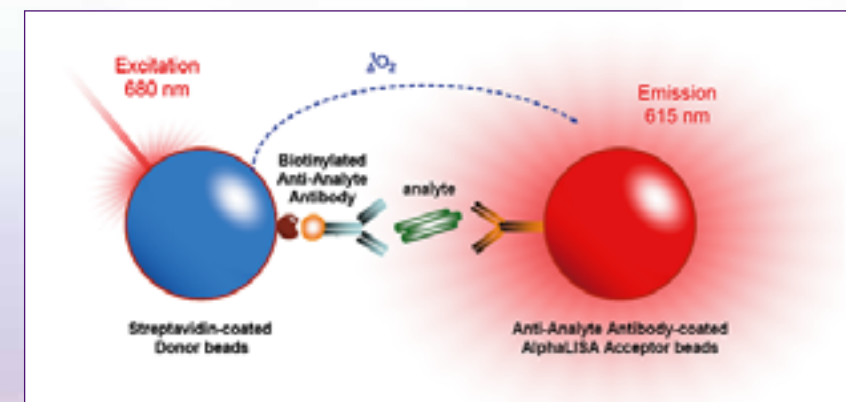
一般ELISA方式，例如：常用之三明治法Sandwich method(如下圖一)，多是將相關待測目標物結合於微量盤底部，結合方式也大多使用Streptavidin (SA)與Biotinylated anti-analyte antibody方法居多，因此待測目標物被一抗抗體及二抗抗體以如同三明治方式夾在中間，故名為三明治法。而AlphaLISA assay做部分改變在於它只是利用二種不同粒子以取代部分結合物，它原理和前敘AlphaScreen類似，只是Donor bead上有一抗抗體，故此Donor bead會與待測物抗原結合；而Acceptor bead 則本身帶有二抗抗體Anti-analyte antibody。也類似以原有三明治法將帶測目標物夾在中間之感覺，當此結構形成時，Donor bead與Acceptor bead相當靠近情況下，若此時以 680 nm 光源激發，產生一連串的能量轉移反應，而Acceptor bead即會發出615nm發散螢光訊號，以供偵測。(圖二)

一般螢光原理中，激發光能量幾乎都比發散能量大，故激發波長也較為能量強之短波長為主；AlphaLISA由於一連串內部能量轉移及強化反應，相較於原螢光方式，其激發光反而較發散光來得低且波長長，故一般螢光儀限制於光源能量、軟體及保護設計，大多無法操作此類型實驗



A sandwich ELISA. (1) Plate is coated with a capture antibody; (2) sample is added, and any antigen present binds to capture antibody; (3) detecting antibody is added, and binds to antigen; (4) enzyme-linked secondary antibody is added, and binds to detecting antibody; (5) substrate is added, and is converted by enzyme to detectable form.

取至http://en.wikipedia.org/wiki/ELISA#Sandwich_ELISA



“眾裡尋它千百度”
到底那一台盤式分析儀才是你的真命天子呢？

BioTek Inc.(USA) Synergy Alpha 系列:

Synergy™ 2

Alpha



AlphaLISA®
AlphaScreen®
SureFire®

At-A-Glance

超微量偵測模組 Take3

可同時偵測16個樣品，樣品僅需2ul、適用於吸收光、螢光及冷光偵測實驗

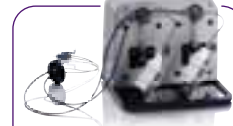
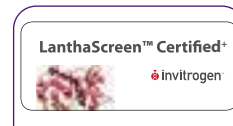
自動分注模組 Dispenser

可針對部分快速螢光及冷光實驗，提供自動分注及同步偵測功能

模組化設計 Module optical system

可針對部分客戶實驗需求，選擇吸收光(全波長)、螢光、冷光、偏極化螢光、時間差螢光模組，或是未來昇級相關模組

	BioTek	Perkin Elmer
	Synergy™ 2 Alpha	Enspire
Take3™ 2 µL Micro-Volume Plate	Option	No
Z focusing	Standard	No
dispenser	Option	No
Fluorescence Polarization	Option	No
Time-Resolved Fluorescence, TR-FRET	Option	No



參考資料來源：

1. AlphaLISA: Human Insulin Quantification Using Synergy 4 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader, <http://www.biotek.com/resources/articles/alphalisa-human-insulin.html>
2. Optimization of Perkin Elmer's AlphaScreen® cAMP Assay on the Synergy™ H4 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader, <http://www.biotek.com/resources/articles/aplhascreen-camp-assay.html>
3. AlphaScreen™: cAMP Quantification Using Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader, <http://www.biotek.com/resources/articles/alphascreen-quantitation-camp.html>
4. Alphascreen assay, <http://perkinelmerreagents.onconfluence.com/pages/releaseview.action?pagelid=328672#AlphaLISA%26AlphaScreenno-washassays-Assayprinciple>
5. Alpha 技術 (Alpha Technology) , <http://www.blossombio.com.tw/Products/AlphaTechnology.html>

從平價機型至頂級機種
吸光/螢光/時間差螢光/偏極化螢光/冷光，到底要選那一種功能？還是統統都要？
選擇濾鏡還是連續光譜？
未來可有擴充空間？

彷彿專屬於您的Synergy系列
可從五大類機型中挑選您要的判讀功能及適合的光學系統
超過90種組合
就像為您量身訂作的一樣

