

はじめに

多くの試験において、特定の分子(例えばタンパク質や核酸)の存在の指針として、または定量のためにアルカリホスファターゼ(AP)の測定が使われています。また、アルカリホスファターゼは抗体、薬剤、酵素などの分析が必要な物質のレベルを測定するためのマーカーとして幅広く使われています。これら測定方法のほとんどはAPに対応した基質を用います。これらの基質による化学発光、発色や蛍光のシグナルを検出し、サンプル中に含まれるAPの定量を行います。

プロメガでは溶液中における高感度なAPの検出キットとしてAttoPhos® System(カタログ番号S1000)を発売しました。このキットではAttoPhos® 蛍光基質を使用しており、この蛍光基質でattomole(10^{-18} mole)レベルの高感度で迅速なAPの検出が行えます。このキットのような蛍光検出法は簡便性、感度、スピード、結果の定量性において他の方法よりも優れた点を示します。本稿では、AP用の蛍光試薬を使った一般的な考察と併せてAttoPhos® Systemの特長をご紹介します。

蛍光法を基にした試験の一般的な考察

APは基質であるリン酸エステルをアルコールと無機リン酸(Pi)に加水分解することでレポーターとして機能します。AttoPhos® SystemでのAPの反応は図1に示したようにBBT(2'-[2-benzthiazoyl]-6'-hydroxy-benzthiazole)とPiを生成します。

発色基質(例えば、para-nitrophenyl phosphate, [pNPP])では、リン酸エステルとアルコールの紫外光～可視光における吸光度特性に一般的に十分差があるので、吸光度により溶液中のアルコールの存在を識別できます。既知の濃度のリン酸エステルを含む溶液において検出される最低のアルコール濃度が検出限界となります。AttoPhos® 基質のような蛍光基質では、吸光度は蛍光波長の変化や蛍光の量子収量の増加に伴って変動します。このように、蛍光基質ではリン酸エステルから産生されたアルコールをより効率的に識別できるため、APの検出を高感度に行うことができます。

蛍光検出ELISA法のような実用例では、試験に含まれる他の成分によって生じる内因性のバックグラウンドによっても試験の感度が決まります。このバックグラウンドは基質やその産生物質以外の内在性の蛍光性物質を指します。蛍光レポーターを用いて検出する場合、以下の点について考慮する必要があります。i) 蛍光物質(または産生物質)の吸収波長や励起波長が内在性バックグラウンドのシグナルに影響を受けない(400nm以上の波長が一般的に使われます)。ii) 大きな励起波長と測定波長の差Stokes'shiftと呼ばれる)が望ましい。iii) 励起光を蛍光放射に変換する際の蛍光分子効率として定義される量子収量が高いほうが望ましい。

内在性のバックグラウンドが存在しない場合、ほとんどの蛍光試験ではStokes' shiftと量子収量によ

り感度が決定されます。小さなStokes's shift(50nm以下)を示す蛍光分子は測定できる蛍光波長の領域が狭いために、感度が低下します。この測定波長領域が狭いことは量子収量、またはその他の特徴によって補われなければなりません。さらに、溶液中では励起波長に起因したラマン散乱により大きなバックグラウンドシグナルを生じます。これは特に狭い蛍光波長の領域や400nm以下の励起波長を用いる場合、さらに重大な要因になります。大きな Stokes' shift(50nm以上)を示し、400nm以上の励起波長を持つ蛍光物質は厳密なフィルター処理を必要とせず、ラマン散乱によるバックグラウンドシグナルを大き

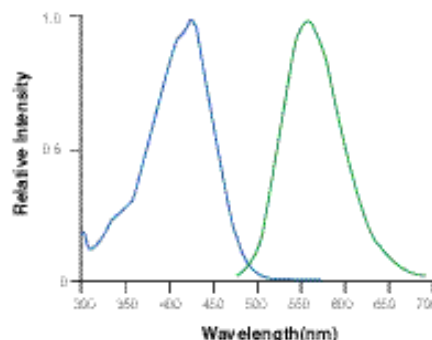


図2. AttoPhos® 基質と AP の産生物質である BBT は大きな Stokes'shift を示している蛍光の励起および測定波長のスペクトラ。緑色の線は575nmの放射波長で回収される励起波長のスペクトラを表す。緑色の線は440nmの励起波長で回収される放射波長を表す。両方のスペクトラともに比較するために補正されている。

く減らすことができます。このことは広範な領域の蛍光放射を集めることを意味し、相対的な感度を増加させます。図2ではAPを用いたAttoPhos® Systemの基質の反応において産生される蛍光物質BBTの大きなStokes's shiftを表しています。

蛍光レポーターとしてAPやその他の酵素を使う方が直接蛍光標識による手法よりも多くの利点があります。酵素のターンオーバーにより大量の蛍光分子を蓄積することができるので、対数的なシグナルの増幅が可能です (Promega Notes No.74, page 8, Figure 3参照)。

AttoPhos® 基質を用いたマルチウェルプレートでのPの検出

AttoPhos® Systemは、AttoPhos® 基質の粉末とAPの検出に最適化されたバッファ(AttoPhos® Buffer)から構成されます。BBTの標準溶液(500ng/ml)も添付されているため、測定機器のキャリブレーションや試験で産生されるBBTに対するスタンダードとして使えます。このキットの利点は、i) 340~430nmの範囲で吸収を示す生物分子によりバックグラウンドの蛍光が低い、ii) 長めの励起波長 (450nm v.s. 350nm)を用いているため、溶液の混濁や測定容器(キュベットやマルチウェルプレート)の構造により生じる散光が少ない、iii) 大きなStokes's shiftを有しているために、幅広い放射波長を回収することができ、蛍光光度計の幅広い範囲で良好な適合性を示す

ことです。

励起波長を420~460nmの範囲に、蛍光波長を525nm以上に設定できるすべてのフルオロメーターでAttoPhos® Systemを使うことができます。販売されているマルチウェルプレート用測定機器から、BioTek、LabSystems、PerSeptive Biosystems、Dynexなどを推奨します。最良の結果を得るために、励起波長は430~440nmに、測定波長は550~560nmにセットしてください。しかし、BBTは365nmという短い波長でも、532nmという長い波長でも問題なく検出することができます。

AttoPhos® ReagentはAttoPhos® 基質をAttoPhos® Bufferに溶かすだけで1mMの調製液にすることができます。AttoPhos® の使い方は、目的のサンプルに加えるだけです。基質やサンプルを調製するときに外部からのAPによるコンタミネーションを避けるように注意してください。低いレベル($\leq 10^{-14}$ M)のAPを含むサンプルを解析する場合、試験に使うすべての試薬についてキットのバックグラウンドの移行に対する影響(ブランクの比率)を事前にチェックしてください。また、サンプル中の微量金属の存在によってもAttoPhos® 基質が自然に加水分解されるので、低レベルのAPを測定する場合は、金属イオンを含む溶液の使用は最低限に抑えるようにしてください。

AttoPhos® Systemはマルチウェルを用いたハイスループットに簡単に適用できます。図3ではAttoPhos® SystemがAP検出において発色試験よりも優れた性能を示すことを表します。発色検出ではAP溶液をpNPPと反応させます。各酵素量に対して観察されるシグナルは酵素が存在しない時のシグナルに対する比率(I_t/I_0)として示されます。観察された反応は検出されたAP量の範囲全てで直線です。この試験系でのpNPPに対する検出限界は10分間で46attomolesです。対照的にAttoPhos® Systemでは10分間で0.74attomolesの検出限界を示し、pNPPに対して60倍の感度を示します。

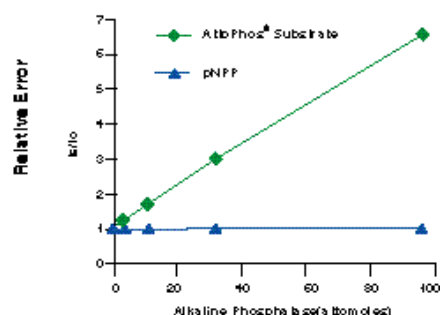


図3. マルチウェルプレートで1mMのAttoPhos® 基質で処理したAPの連続的タイトレーションで観察された蛍光シグナル。AttoPhos® 基質またはpNPPをAPと10分間インキュベートし、それぞれの蛍光とOD₄₀₅のシグナルを観察した。酵素がない状態(I_0)でのシグナルに対するそれぞれの酵素量で得られたシグナルとしてデータを表した。APの標準品はストックのAP(365μg/ml)を4fM~26pMとなるようにバッファ[50mM Tris-HCl(pH9.3), 1mM MgCl₂, 0.1mM ZnCl₂, 1mM spermidine, 0.1% BSA]で希釈した。pNPP溶液は1mMとなるようにバッファ[1M diethanolamine, 1mM MgCl₂]で希釈した。pNPPの発色検出はMolecular Devices SpectraMAX® プレートリーダーを用いて405nmで行った。200μlの反応がLinbro®/Titertek平底96ウェルプレートで行われた。AttoPhos® 基質を用いたAPの蛍光検出は100μlの反応がDynex MicroFLUOR® 96ウェルプレートで行われた。測定はPerSeptive Biosystems Cytotofluor® プレートリーダーで行われた。AttoPhos® 基質の産物であるBBTを測定するために450nm±50nmの励起フィルターと580nm±50nmの測定フィルターを用いた。検出限界(AttoPhos® 基質では0.74attomoles、pNPPでは46attomoles)は酵素のない状態で得られた平均値の上の2つの標準偏差である。

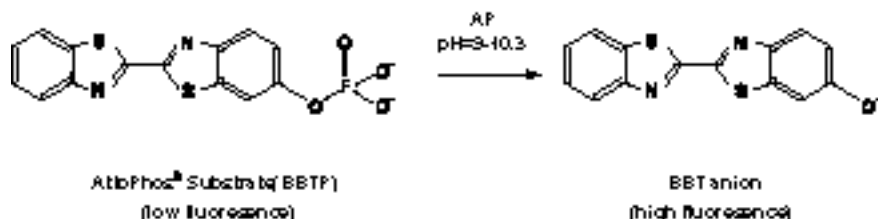


図1. アルカリホスファターゼ(AP)を用いたAttoPhos® 基質の反応。BBTPからBBTとPiが産生される。