

基礎実験系から高速多検体処理系までの ルシフェラーゼレポーター試験に適応した発光試薬： Bright-Glo™ と Steady-Glo™ Luciferase Assay Systems



Erika Hawkins, M.S., Braeden Butler, B.S., and Keith V. Wood, Ph.D.
Promega Corporation

Bright-Glo™^(a) と Steady-Glo™^(a,b) Luciferase Assay Systemsは、ほとんどのホタルルシフェラーゼレポーター試験の実験フォーマットに適した発光試薬です。これらの試薬は細胞培養に加えるだけのワンステップ型と複数操作を必要とするマルチステップ型フォーマットに対応し、マニュアル操作から全自動化システムまで、また少数検体から多検体まで様々なアプリケーションで十分に高い性能を発揮するよう最適化されています。これらの発光試薬は非常に優れた試験精度を最高の感度で示します。本稿では、それぞれの発光試薬の特徴を、各研究者の目的に合わせた選択の手助けとなるようご紹介します。

はじめに

この10年間でホタルルシフェラーゼを利用した研究方法論は目覚ましい多様化を遂げました。今日では、1日に数サンプルの処理・分析から1時間数千サンプルの処理・分析まで実施する実験戦略がとられています。個々のサンプルをシンプルなルミノメーターで測定する一方、CCDカメラを利用した高価なルミノメーターで一度に数千検体を測定することもあります。これらの多様化した方法論をサポートするために、プロメガはBright-Glo™ Luciferase Assay SystemおよびSteady-Glo™ Luciferase Assay Systemを開発しました。これらの発光試薬はワンステップ、又はマルチステップ仕様で利用でき、非常に優れた試験精度を最も高い感度で提供できるように設計されています。そして、これらは基礎実験から創薬プロジェクトのスクリーニングシステムまでの広いニーズに適応しています。

Bright-Glo™とSteady-Glo™の各試薬は、1990年に発売されたプロメガ社Luciferase Assay Systemと比較した場合、試験における性能や使用方法の自由度がより向上しています。Luciferase Assay Systemはこれまでに標準試薬として幅広く利用されてきましたが、マイクロタイタープレート用に最適化されていませんでした。Bright-Glo™とSteady-Glo™試薬は96、384、または1536穴プレートで効率良くかつ精度を保った定量ができるよう設計されています(1,2)。さらに、Bright-Glo™は方法論上、一回に測定できるサンプル量が増えるため、ほとんどのアプリケーションにおいてLuciferase Assay Systemに比べ高い感度が得られます(図1)。

Bright-Glo™とSteady-Glo™の各試薬は、感度と発光時間が反比例する関係にあるため相補的な特徴を持ちます(図1; 1)。一般にルシフェラーゼ発光試薬は発光時間が長くなると、感度が低くなる傾向があります。1998年に開発されたSteady-Glo™試薬は、1時間に10%程度の発光量の減衰しか見られない長時間発光型試薬です。この発光試薬は、高速多検体処理型の試験系でよく行なわれているように、多数のマイクロプレートをバッチ方式で処理できるようにデザインされています。しかし、長時間発光を得るために試験系の感度を下げなければなりませんでした。

反対に、新開発のBright-Glo™発光試薬は、発光時間は短いが高感度であり、一般的な用途のほか連続サンプル処理用の自動化機器を使った高速多検体処理にも利用できます。

表1. プロメガ ルシフェラーゼ発光試薬の特徴

	Bright-Glo™ Reagent	Steady-Glo™ Reagent	Luciferase Assay Reagent
フォーマット	ワンステップまたは マルチステップ	ワンステップまたは マルチステップ	マルチステップ
処理方法	連続	バッチ	マニュアル
ステップ数	1	1	4
感度	最も高感度	低い	高感度
発光半減期	約30分	約5時間	約12分
精度	高	高	高
細胞溶解時間	2分以内	5分以内	別途細胞溶解 ステップが必要
試薬調製時間	30秒以内	30秒以内	約40分

Bright-Glo™とSteady-Glo™はどちらも定量性、感度、利便性に優れた発光試薬です。これら二つの試薬の選択は、感度と発光時間のどちらを優先させるかにより決まります(表1)。また、両方とも同じ基本方針の元に設計されており、実験系の必要性に応じて互換的に利用することも可能です。この互換性は、特に基礎実験から多検体処理試験系への立ち上げの過程で役に立つでしょう。このようにすべての段階で同じ試薬を一貫して使うことにより、培養細胞株や試験精度の確認を繰り返す行う必要がありません。

Bright-Glo™とSteady-Glo™発光試薬は、マニュアルまたは全自動化のフォーマットを含む様々なアプリケーションでルシフェラーゼレポーター試験に用いることができます。

基礎研究一般での方法

従来法でルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現を定量する場合、培養液を取り除き、細胞を溶解する必要があります。この方法論は2つの構成要素である“細胞”と“培地”を分離するためNonhomogeneous型(マルチステップ型)と呼ばれ、主にマニュアル(手作業)で行なわれます。Bright-Glo™とSteady-Glo™発光試薬はいずれもこのマルチステップ法で使用できますが、サンプルが96穴プレート1枚に載せられる数である場合、Bright-Glo™を使用することをお勧めします。長時間発光を必要としない系ならば、Bright-Glo™を使用することにより、高感度な結果が得られます。

Bright-Glo™の発光は5分間で約10%減衰します(半減期は約24分)。相対的に短い発光時間にするこで、感度をSteady-Glo™の約7倍にすることが可能になりました。Steady-Glo™に比べ短い発光時間ですが、96穴プレートの測定は一般に1ウェルあたり1~2秒、プレートあたり5分以内で完了しますので、試験系自体に影響はほとんどありません。

ルシフェラーゼの発現は、通常コントロールと比較した相対的な数値で表されます。96穴プレートで定量を行なう場合、コントロールとサンプルが同じプレートに含まれるようにすると、それぞれが、3分以内に測定されます。したがって、Bright-Glo™試薬を添加したタイミング(順番)に関係なく、コントロールとサンプル間のデータの比は一定に保たれます。ただし、アッセイ感度を上げるためにはBright-Glo™の添加後

15分以内に測定することを推奨します。

統計的ばらつきを少なくするためには、同じプレート内で複数個の同じサンプルや複数個のコントロールのデータをそれぞれ平均します。また、試験精度が発光時間の違いによる影響を受けるを防ぐためには、なるべく近いウェル同士にサンプルとコントロールを入れるか、コントロールを最初と最後のウェルに置きます。こうすることで、実験データのばらつきは5%未満を示すはずで

絶対量で定量したい場合は、既知の濃度の精製されたホタルルシフェラーゼをコントロールとして加えます。これにより、ルシフェラーゼ発現量はfemtograms(10^{-15} grams)またはattomoles(10^{-18} moles)単位で定量できます。2、3種類の濃度のルシフェラーゼを用意するだけでスタンダード直線の作成が可能です。ルシフェラーゼアッセイは桁にわたる酵素濃度の範囲で直線性を示します。

従来のマルチステップ型方法論では、培地を取り除いた後、数百 μ lの溶解剤で溶解します。溶解された細胞は96穴プレートに分注し、そこへマルチチャンネルピペッターなどを利用し同時に発光試薬を加えます。標準的なLuciferase Assay Reagentでは100 μ lの発光試薬に対しわずか20 μ lの細胞溶解液しか使えません。しかし、Bright-Glo™では100 μ lまでの溶解液を使用することができます。1反応での溶解液量を増やすことによりアッセイ感度が上がります。これがBright-Glo™を高感度発光試薬として推奨する理由です。

マルチステップ型発光試薬では比較的少ないサンプル数を処理するのは簡単ですが、サンプル数が増えるにつれ作業量がかなり増えてしまいます。その点ワンステップ型発光試薬は培養した細胞に培地を除かず直接試薬を添加できるため、ライセートを別途調製する必要がありません。ワンステップ型試薬は直接培地に加えると、そこで細胞を溶解し発光反応を開始します。また、96穴プレートにサンプルを移動させる手間を省くために、プレートで直接細胞培養を行いません。培養後に発光試薬を培地に対して等量加え2、3分放置した後、96穴プレート用のルミノメーターで測定します。

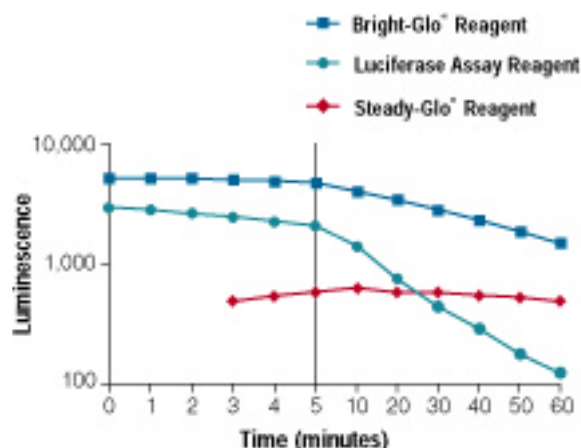
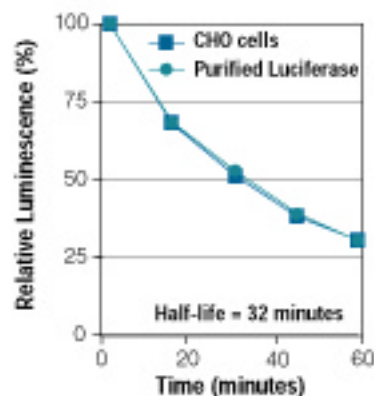


図1. プロメガルシフェラーゼ発光試薬の概要

精製されたルシフェラーゼ(2.2×10^{-10} M with 1mg/ml BSA)を、各試薬のテクニカルマニュアルに従い96穴プレートで測定した。ルシフェラーゼはGlo Lysis Bufferに懸濁し、100 μ lを Steady-Glo™ とBright-Glo™ 発光試薬(3,4)で測定した。Luciferase Assay Reagentについては20 μ lのCell Culture Lysis Reagent (5)を使用し、マニュアルに従って測定した。それぞれの発光反応は発光試薬を加えることにより開始し、グラフ中の各線は96穴プレートの1ウェルを1秒の積算時間で計測して得られた数値を経時的に表している。各データは96穴プレートの数値の平均でプロットし、相対標準誤差は3.3%以下であった。Glo Lysis Bufferについての詳細はテクニカルサービス(prometec@jp.promega.com)までお問い合わせ下さい。

A. CHO Cells/F12 Medium



B. 293 Cells/DMEM Medium

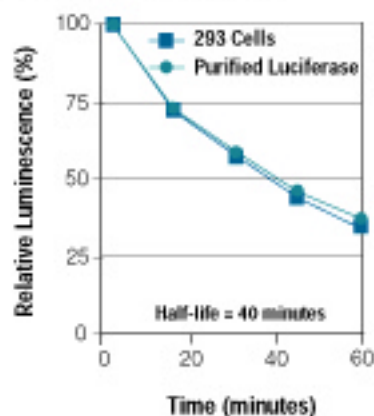


図2. 哺乳類培養細胞で安定発現されたルシフェラーゼと精製ルシフェラーゼによる発光反応速度の比較

100 μ lの精製ルシフェラーゼ(2.2×10^{-10} M with 1mg/ml BSA)またはルシフェラーゼレポーター遺伝子を安定に形質導入した細胞を96穴プレートに入れサンプルとした。パネルA: CHO細胞(ウェル毎に約 1×10^4 個)をF12培地で培養。パネルB: 293細胞(ウェル毎に約 2.5×10^4 個)をDMEM培地で培養。発光測定は各ウェル毎に1秒間の積算時間で計測した。細胞内で発現されたルシフェラーゼと精製ルシフェラーゼの相対発光度は各培地中で同様の経時変化を示した。

マルチステップ方式で、96穴プレートで少数のサンプルをアッセイする場合、最も高い感度を得るためにはBright-Glo™をお勧めします。Bright-Glo™をサンプルウェルに加えてから細胞溶解の為に2分程放置し十分溶解させた後、発光を測定します。細胞によってはより長い細胞溶解時間が必要になることもあります。

Bright-Glo™とSteady-Glo™発光試薬は、細胞培養培地(例: DMEM、RPMI 1640、MEM α 、F12)に10%までのウシ血清またはウシ胎児血清を加えた条件下で最適化しています。この発光反応は培地に対して試薬1の条件下で行なわれるため、培地の組成が発光時間や感度に影響することがあります。しかし、サンプルとコントロールで同じ培地が使われるため、相対発光度に対するこれらの影響は一般に少ないと予想されます。これは、図2において細胞で発現されたルシフェラーゼと精製ルシフェラーゼの発光反応の様子が同じ培地条件ではほとんど変わらないことから示されます。

Bright-Glo™とSteady-Glo™発光試薬は幅広く一般の哺乳類細胞培養液に適用するように設計されましたが、特殊な培地では何らかの影響が出る可能性もあります。このような影響を予測できるようにテクニカルマニュアル(3,4)には広範囲にわたる条件下での詳細な試薬実用例を示しました。

高速多検体スクリーニングでの使用法

ハイスループット(高速多検体)スクリーニングは、1時間に数千から1万検体以上を処理する試験系がどれだけ自動化できるかに懸かっています。そのため、検体から培地を取り除くような操作は煩雑さを高め、時間の浪費になるため、作業を簡略化できるワンステップ型試験系の構築が重視されます。さらに昨今では高密度な84穴または1536穴プレートの登場により試験系の小型化が進みつつあり、試験系の処理能力を向上させる傾向にあります。高密度プレートをマニュアル操作で処理するのは実際不可能であると考えられます。このような背景から試験系を自動化する要素を考慮に入れ開発されたのが、Bright-Glo™とSteady-Glo™発光試薬です。

通常自動化されたハイスループットスクリーニングでは10~40マイクロプレート分の検体を1スタックと呼ばれる単位で処理します。それぞれのマイクロプレートには必要なコントロールが含まれており、検体の測定結果はそのコントロールと比較されデータとなります。このような実験フォーマットにより1スタックを処理する間に生じる可能性のある実験誤差を補正しています。スタックの処理法としてはバッチ法と連続処理法の2種類があります。

バッチ処理法で検体を処理する場合(図3、パネルA)、1ステップの処理を全てのプレートで完了した後、次のステップに進みます。ルシフェラーゼレポーター試験の場合、全てのプレートに発光試薬を加えてからルミノメーターで測定します。この方法は比較的シンプルな設計で自動化が可能であり、プレートスタッカーがピペティングワークステーションにつながり、次のプレートスタッカーからルミノメーターへとプレートが流れるようになっていきます。プレートスタックはマニュアルで次のステーションに移動させることもできます。これらの理由でバッチ処理法はハイスループットスクリーニングでは比較的人気のある手法となっています。

バッチ処理法では全てのスタック中のプレートを処理するのに数時間かかることがあり、長時間の発光を必要とします。Steady-Glo™発光試薬はこのような実験系に威力を発揮します。プレート内の処理サンプルとコントロールの測定は必ず1~3分以内に行なわれるため、相対発光度データの精度は十分に保たれます。また、この発光試薬は発光時間が

延長され十分な感度をスクリーニングが終了するまで持続するよう設計されています。

一方連続型の処理法(図3、パネルB)では、それぞれのプレートが全工程を連続処理されます。ルシフェラーゼレポーター試験では、ひとつのプレートに発光試薬が加えられ、続けてルミノメーターで測定されます。通常この方法ではプレートが連続して移動するため、ピペティングとルミノメーターワークステーション間でプレート移送を自動化する必要があります。このように、移送ロボットが全てのワークステーションの機能をコーディネートする必要があり複雑な自動化が必要となりますが、各ワークステーションが休むことなく連続して稼動することにより、一定時間内でより多くの検体を処理することが出来ます。

連続処理法は長時間発光が不要なのでルシフェラーゼレポーター試験に適しています。短時間発光型試薬では感度(発光量)が増加するためルミノメーターでの測定(積算)時間も短縮できます。このようなアプリケーションには、Bright-Glo™をご利用いただけます。移送ロボットを導入し、連続法でシステムを構築した場合、処理能力は一番遅い工程にかかる時間に左右されます。その工程はルシフェラーゼレポーター試験では通常ルミノメーターでの測定ステップです。超ハイスループット型1日に約100,000検体のシステムで384穴や1536穴のプレートを一度にCCDカメラを使ったルミノメーターで測定する場合、実際にここが一番時間の掛かるステップとなります。高密度プレートを処理する場合、CCDカメラでの測定はPMT(Photo-Multiplier Tube)を使ったルミノメーターより早くできますが、CCDはPMTより感度が低いという難点があります。

Bright-Glo™は高感度な測定ができるため、このような場合に処理能力を上げるために役立ちます。また、前述のとおり実験サンプルとコントロールが1プレートに含まれ比較的短時間内で測定されます。CCDカメラ使用の場合、全てのウェルが同時に測定されます。従って、データ精度は短い発光時間の試薬を使用するにも関わらず、高い水準を維持することができます。Bright-Glo™の感度はSteady-Glo™よりも早く減衰しますが、連続法での短い処理時間内では十分に高感度で維持されます。Bright-Glo™の試験感度は、約1.5時間の間Steady-Glo™よりも高く維持されます(図1)。

A. バッチ処理法

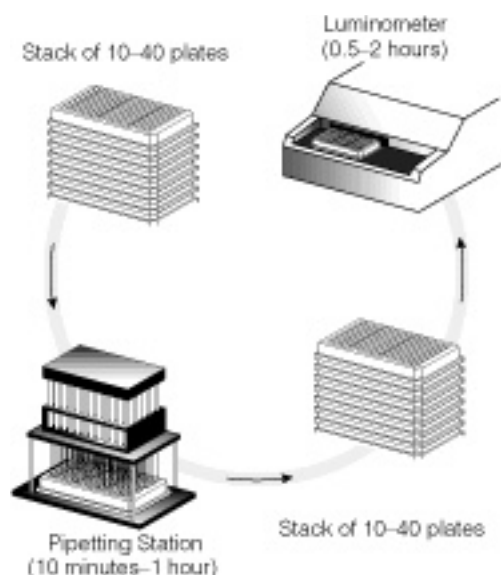
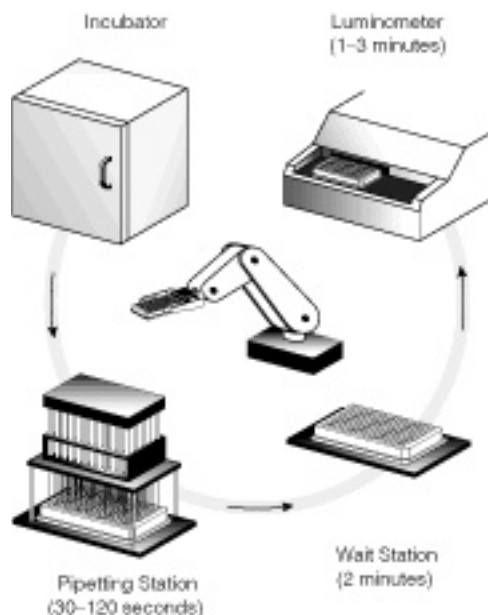


図3. レポーター試験をバッチ法と連続法でデザインした場合の比較

パネルA: 一度にセットされる全てのプレートがユニットとして処理される。全てのプレートが一度にインキュベーターから取り出され、試薬が加えられ、そして発光測定をするためにルミノメーターへと移される。

B. 連続処理法



パネルB: それぞれのプレートは個別に各ステップで処理される。複数のワークステーションが同時に稼動し、全工程においてプレート当たりに必要な処理時間の短縮を図れる。

結論

Bright-Glo™とSteady-Glo™発光試薬は、すべてのルシフェラーゼレポーターアッセイのニーズに応えるように設計された機能的に相補的な関係にある発光試薬です。これらは、マニュアルと全自動化されたシステムの両方で最適化され、ワンステップまたはマルチステップ方式のどちらでも使用可能です。したがって、これらの試薬は基礎研究から高速多検体処理系(ハイスループットスクリーニング)まで一貫してご利用いただけます。適応するルミノメーターもマルチウェルプレートリーダータイプのものからCCDカメラを利用したタイプのものまでご利用いただけます。また、全てのタイプのアプリケーションで、高いデータ精度と感度を提供し、操作も簡単です。さらに、Bright-Glo™発光試薬はほとんどのアプリケーションにおいて最も高感度のデータを得ることができます。プロメガが販売しているこれらの汎用性の高いレポーター試験試薬を利用することにより、プロジェクトの段階間および研究室間での効率的な技術移入が可能になります。これらルシフェラーゼ発光試薬の詳細については、www.promega.com/biolumをご参照下さい。

参考文献

1. Hawkins, E., Jennens-Clough, M. and Wood, K.V. (1999) *Promega Notes* **70**, 7.
2. Wood, K.V. (2000) *Promega Notes* **74**, 3.
3. *Bright-Glo™ Luciferase Assay System Technical Manual #TM052*, Promega Corporation.
4. *Steady-Glo™ Luciferase Assay System Technical Manual #TM051*, Promega Corporation.
5. *Luciferase Assay Systems Technical Bulletin #TB281*, Promega Corporation.

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
Bright-Glo™ Luciferase Assay System	10ml	E2610	16,000
	100ml	E2620	89,000
	10 × 100ml	E2650	890,000
Steady-Glo™ Luciferase Assay System	10ml	E2510	14,000
	100ml	E2520	79,000
	10 × 100ml	E2550	790,000
Luciferase Assay System	100回分	E1500	13,000
Luciferase Assay Reagent 10-pack	1,000回分	E1501	78,000
Luciferase Assay System with Reporter Lysis Buffer ^(a)	100回分	E4030	14,000
Luciferase 1000 Assay System ^(a)	1,000回分	E4550	76,000

Bright-Glo and Steady-Glo are trademarks of Promega Corporation.

^(a)U.S. Pat. Nos. 5,283,179, 5,641,641, 5,650,289, Australian Pat. No. 649289, and European Pat. No. 0 553 234 have been issued to Promega Corporation for a firefly luciferase assay method, which affords greater light output with improved kinetics as compared to the conventional assay. Certain applications of this product may require licenses from others.

^(b)Patent Pending. U.S. Pat. No. 5,283,179, Australian Pat. No. 649289 and other patents. Certain applications of this product may require licenses from others.