

Glo and Go with Beta-Glo™ Reagent

Beta-Glo™ Assay Systemのご紹介

By Jared Browning, B.A., Michael Beck, M.S., and Rita Hannah, Ph.D., Promega Corporation

アブストラクト

Beta-Glo™ Assay Systemは、細胞内のβ-ガラクトシダーゼの定量を行う発光ホモジニアス試薬です。Beta-Glo™ Reagentは明るい発光シグナルを生じ、現行のアッセイ法に比べ数倍の感度が得られます。アッセイのシングルステップフォーマット（添加、混和、測定）で、マルチウェルプレートの分析を容易にするためにデザインされていますが、シングルチューブフォーマットとしてもご利用いただけます。発光シグナルは試薬添加後数時間安定に維持され、4 logの幅広いダイナミックレンジをカバーします。これらの特長は様々な細胞イベントを研究する上でBeta-Glo™ Assayを柔軟で強力なツールにします。

Beta-Glo™ Assay Systemは、β-ガラクトシダーゼの定量をシングルチューブおよびマルチウェルフォーマットでシンプル、高感度、柔軟にアッセイするためのシステムです。

はじめに

β-ガラクトシダーゼは、単一のレポーター分子またはホタルルシフェラーゼとのコレポーターとして広く利用されています。酵母のツェハイブリッドシステムをベースとしたタンパク質間相互作用の研究や酵素の相補性アッセイなどで使用されます。β-ガラクトシダーゼの定量用に多くの基質が市販されています。これらの基質は通常、発光、蛍光、発色フォーマット用です。我々が紹介するBeta-Glo™ Assay Systemは、ホモジニアス試薬で、サンプルを前処理することなく数時間安定な明るい発光シグナルを供給します。

Beta-Glo™ Assayの概要

Beta-Glo™ Assay System（カタログ番号E4720、E4740、E4780）は、2つの酵素反応を利用します。基質（6-O-β-galactopyranosyl luciferin）がβ-ガラクトシダーゼにより切断されてルシフェリンが遊離し、ルシフェラーゼにより触媒される反応に使用されます。この反応により生じる発光シグナルは、存在するβ-ガラクトシダーゼ量に比例します（図1）。この1種類の試薬は、細胞を溶解し、発光シグナルの生成に必要な構成成分が全て含まれるため、サンプルの多検体処理が可能です。

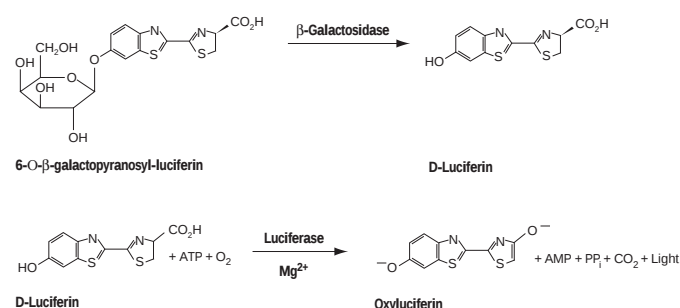


図1. Beta-Glo™ Assay Systemにおける2つの酵素反応

発光レベルと直線性

Beta-Glo™ Reagentの特長の1つは、高レベルの発光シグナルを生成することです。図2AはBeta-Glo™ Reagentが、市販のホモジニアスβ-ガラクトシダーゼアッセイよりも3倍明るい光を生成することを示しています。Beta-Glo™ Reagentのシグナルは96ウェルプレートを使用した場合、酵素濃度100fg ~ 1ng/ウェルの範囲で直線性を示します（図2B）。そのため、Beta-Glo™ Reagentは、O-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG) をベースにした標準的な比色定量法よりも数百倍の感度を有します。優れた感度をもたらすBeta-Glo™ Reagentによる強い発光シグナルは、CCDイメージャー、低容量フォーマット（例：384ウェルプレート）を用いたレポーターの定量や発現レベルの低いサンプルの定量を容易にします。

シグナルのキネティクス

Beta-Glo™ Reagentにより生じる安定した発光シグナルは、試薬添加30分後から4時間後まで測定することができます。この安定性はサンプル処理に柔軟性を与えます。発光シグナルには、最大発光シグナルに

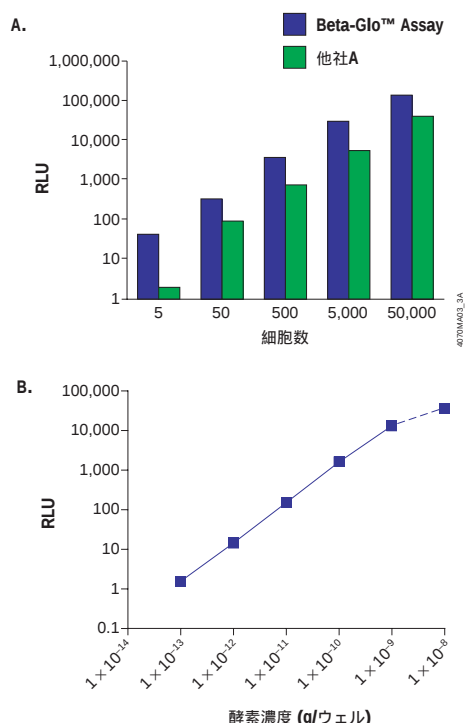


図2. Beta-Glo™ Assay の発光レベルと直線性

パネルA. 細胞数の異なるψ2BAG細胞（β-ガラクトシダーゼ安定発現）からBeta-Glo™ Assay Systemおよび他社Aの発光アッセイシステム（製造元のインストラクションに準ず）を用いてβ-ガラクトシダーゼ活性を測定した。発光はBerthold Orion luminometerを用い、ウェルあたり1秒間測光した。パネルB. β-ガラクトシダーゼを25mM HEPES, 0.1% Prionex® で連続希釈し、96ウェルプレートに1ウェルあたり100μl加えた。等量のBeta-Glo™ Reagentを加え、発光は30分後にDynex MLX® luminometerで測光（0.5秒/ウェル）した。全ての値はバックグラウンド発光で補正した。全てのデータポイントはn = 3。

到達するまで試薬添加後約30分～60分のランプアップ時間が存在します（図3）。このインターバルにおける発光シグナルの最大変動比率は、通常＜20%/10分間です。96ウェルプレートフォーマットで1ウェルあたり1秒間 測光する場合、プレート1枚を測定する間の発光シグナルの最大変動比率は5%以下です。60分後の発光シグナルは、4時間後まで1時間あたりの変動比率 10%を維持します。このシグナルの安定性により、ルミノメーターを用いたマルチウェルフォーマットのバッチおよび連続処理を容易に行うことができます。

試薬の頑健性

Beta-Glo™ Assayでは、各ウェルまたはチューブの培地と等量のBeta-Glo™ Reagentを使用します。DMSOやエタノールなどの有機溶媒は、セルベースアッセイによる化学物質テストでそれを溶かすためにしばしば使用されます。さらに標準的な発光反応は、酵素の触媒比率に依存するため、温度の変化に左右されます。反応温度および有機溶媒は、アッセイのパフォーマンスに負の影響を及ぼす可能性があります。しかし、Beta-Glo™ Reagentはこれらの条件下でも優れた頑健性を持つことが認められています。

室温（22℃）および27℃で平行してBeta-Glo™ 反応を行い、発光に及ぼす温度変化の影響をテストしました。バックグラウンド補正を行った値は、両温度で行ったBeta-Glo™ 反応で得られた発光シグナルの平均値の差が11%以下であることを示しました（データ未掲載）。また、一定の濃度幅の溶媒を用いた場合のBeta-Glo™ Reagentの適応性を評価しました。0.5～2%幅の溶媒濃度（試薬添加前）はBeta-Glo™ Reagentによる発光に若干の影響を与え、シグナルが10%以下減衰する結果になりました（データ未掲載）。

Beta-Glo™ Assayの実施

Beta-Glo™ Assay Systemは2つの試薬（凍結乾燥の基質とアッセイバッファー）で構成され、2つを合わせてBeta-Glo™ Reagentを調製します（図4）。Beta-Glo™ Assayは室温（約22℃）での使用が最適で、他のアッセイフォーマットとは異なり、高い温度でインキュベーションする必要はありません。Beta-Glo™ Reagentは、培地を含む細胞と等量加え、混和後、発光シグナルがピークに達するまで30～60分間、室温でインキュベーションします。Beta-Glo™ Reagentは、バクテリアのライセートに加え、広範な哺乳動物細胞タイプにも適応することが示されています。しかし、Reporter Lysis Buffer（カタログ番号 E3971）で調製したバクテリアライセートを用いた場合に最適の結果が得られています。発光シグナルがピークに達すれば、試薬添加 4時間後まで測定することができます。

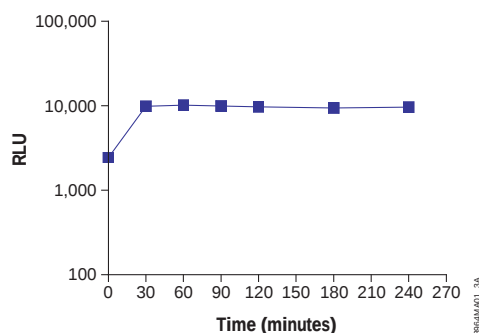


図3. Beta-Glo™ Assayのシグナルキネティクス

96ウェルプレートに分注した25mM HEPES, 0.1% Prionex®に精製したβ-ガラクトシダーゼ（1×10⁶g [0.5mU]; Sigma Cat# G5635）を添加した（総ボリューム100μl/ウェル）。各ウェルにBeta-Glo™ Reagentを添加し、Dynex MLX® luminometer（0.5秒/ウェル）で4時間以上にわたってシグナルを測定した。値は3連続体の平均値でバックグラウンドを補正した。

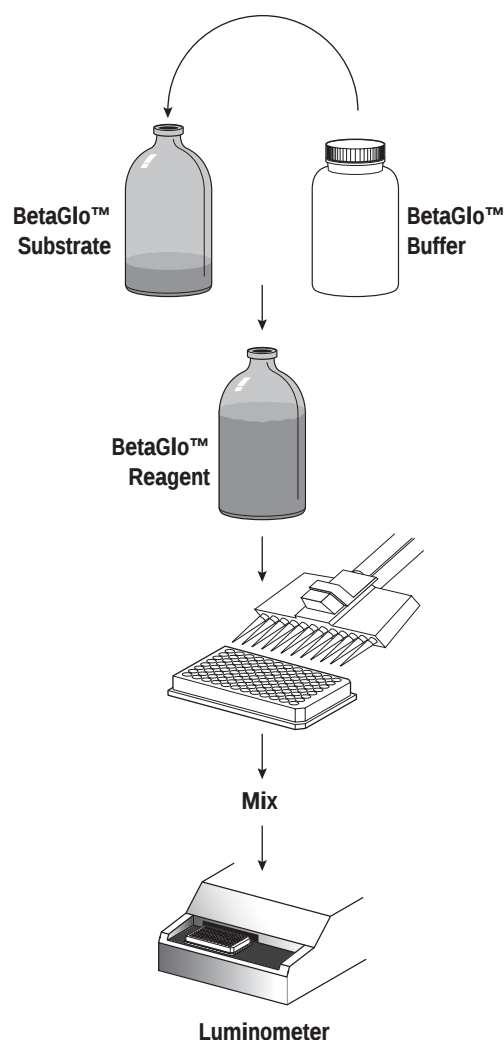


図4. Beta-Glo™ Assayプロトコル

Beta-Glo™ Assay SubstrateとBufferを混和し、Beta-Glo™ Reagentを調製。培地と等量のBeta-Glo™ Reagentを細胞を含む培地に添加。サンプルを室温で30分間インキュベーションし、ルミノメーターで測光した。

概要

Beta-Glo™ Assay Systemはシンプルで、優れた感度、柔軟性を持ち、頑健なβ-ガラクトシダーゼの定量が行えます。シングルステップで生じる長時間発光および室温での操作は、シングル-チューブ反応、マルチプレートの連続およびバッチ処理に柔軟性を与えます。

プロトコール

- ◆ Beta-Glo™ Assay System Technical Manual #TM239, Promega Corporation. (www.promega.com/tbs/tm239/tm239.html)

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Beta-Glo™ Assay System	10ml	E4720	13,000
	100ml	E4740	93,000
	10 × 100ml	E4780	580,000