

Caspase-Glo™ 3/7 Assay: Use Fewer Cells And Spend Less Time With This Homogeneous Assay

少数の細胞で迅速にアッセイできるホモジニアスタイプの Caspase-Glo™ 3/7 Assay

By Martha O'Brien, Ph.D., Richard Moravec, B.S., and Terry Riss, Ph.D., Promega Corporation

はじめに

新しく開発されたCaspase-Glo™ 3/7 Assayは、抗Fas抗体で処理したJurkat細胞 20個からでもカスパーゼ-3および-7を検出することができます。この発光法のアッセイはマルチプレートフォーマットのためにデザインされており、洗浄や培地の除去が不要なため、ハイスループットスクリーニングのアプリケーションに理想的です。このアッセイ法は頑健なアッセイでありながら優れたZ'-factorを示します。

アッセイ原理とプロトコル

カスパーゼカスケードの活性化はアポトーシス経路のなかで欠くことのできないイベントです。カスパーゼ-3は、細胞を整然とした崩壊に導く数多くのタンパク質切断の引き金を引く“執行人”の役割を持つ重要なカスパーゼ酵素の1つです。カスパーゼ-3活性の検出は、アポトーシスの陽性マーカーとして汎用されています。我々はホモジニアスタイプの発光でカスパーゼ3/7を検出するCaspase-Glo™ 3/7 Assayを開発しました。このシステムは、細胞または精製酵素からカスパーゼ活性をモニタリングする非常に感度の高い方法です。アッセイでは、カスパーゼ-3/7により認識されるDEVD配列を含む発光前駆基質を使用します。

本アッセイは、カスパーゼ-3/7活性、ルシフェラーゼ活性および細胞溶解に最適化されたバッファシステムに含まれた発光前駆体カスパーゼ-3/7基質を供給します。“添加-混和-測定”のフォーマットでCaspase-Glo™ Reagentを1回添加すると細胞が溶解し、カスパーゼによる基質の切断が起こり、ルシフェラーゼにより消費され“グロータイプ”の発光シグナルを生じるアミノルシフェリンが遊離します(図1)。生じた発光シグナルは、存在するカスパーゼ活性量に比例します。このホモジニアスなCaspase-Glo™ 3/7 Assayはマルチウェルフォーマットで使用するためにデザインされており、カスパーゼ活性またはアポトーシスの自動化ハイスループットスクリーニング(HTS)に理想的です。細胞の洗浄、培地の除去、多くのピペッティング操作は不要です。

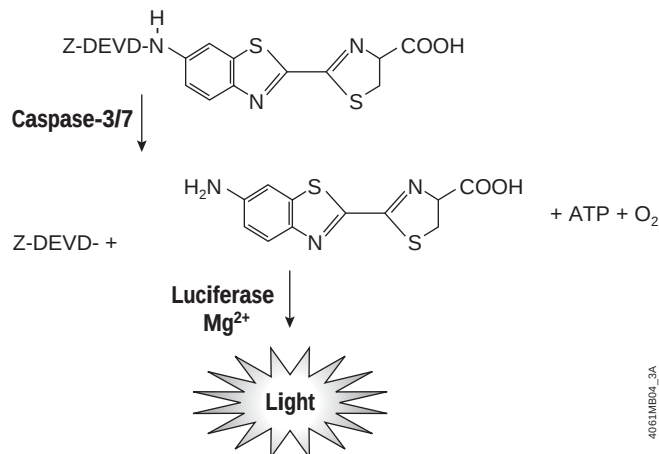


図1. Caspase-Glo™ 反応

発光はカスパーゼ-3活性に比例

Caspase-Glo™ Reagentは、カスパーゼ-3/7活性量に直接的に比例する発光を生じます。発光はカスパーゼ濃度規模 4オーダー以上(図2)または広い細胞密度幅(図3)で直線性が得られます。発光シグナル強度は幾分減少するものの4時間以上にわたり安定です(図4)。この安定性により、試薬インジェクターの無いミノメーターが使用でき、また数時間 測光を遅らせることもできます。

最短の時間で最大のシグナル

蛍光基質を使用するカスパーゼアッセイは、放出される蛍光物質の蓄積に依存します。すなわち、カスパーゼ切断後につづいて遊離の蛍光物質が蓄積するため、経過時間に従ってシグナル/バックグラウンド比が上昇し、長いインキュベーションは感度を増加させます。これとは対照的に、このホモジニアス-発光アッセイは、カスパーゼ切断産物の蓄積に依存しません。発光前駆基質の切断により放出されるアミノルシフェリンは、すぐにルシフェラーゼにより消費されます。最大感度は、カスパーゼ/ルシフェラーゼ活性が定常状態に達することにより得られます。最大感度(定常状態)に達するまでの時間は約1時間以内です。最大シグナルに到達するまでの正確な時間はアッセイシステムや培養条件に依存します。蛍光アッセイに比べ発光アッセイは短時間に優れた感度が得られ、シグナルは数時間にわたり非常に安定です。

高感度アッセイで必要な細胞数が低減

以下の考えられる3つの原因により蛍光アッセイの感度には限界があります。1) ペプチドが結合した蛍光物質と結合していない蛍光物質のスペクトルがやや重なり、固有の蛍光バックグラウンドの原因となる。2) ペプチドが結合した蛍光物質の精製が不完全で、混入した遊離の蛍光物質の蛍光がバックグラウンドの原因となる。3) 細胞やアッセイしている化合物に由来する自家蛍光がバックグラウンドの原因となる。

Caspase-Glo™ 3/7 Assayでは、ペプチドが結合したアミノルシフェリンがルシフェラーゼの基質とならないため、事実上 固有の発光はありません。また、遊離のアミノルシフェリンが混入していてもアッセイの開始前にルシフェラーゼにより消費され、自家発光は大きな問題にはなりません。このアッセイにおけるバックグラウンド発光は非常に低く、他のカスパーゼアッセイフォーマットでは得られない優れたシグナル/バックグラウンド比および感度を実現できます(1-3)。このアッセイは0.1pgという微量の活性化カスパーゼ-3を検出することができます(図2)。抗-Fas mAbによりアポトーシスを誘導したJurkat細胞のタイトレーションでは、抗-Fas mAb処理細胞20個を検出しました(図3)。このアッセイの感度により、正確なカスパーゼ活性測定に必要なウェルあたりの細胞数を抑えることができ、阻害剤スクリーニングに必要な組換え酵素を削減できます。

4031MB04_3A

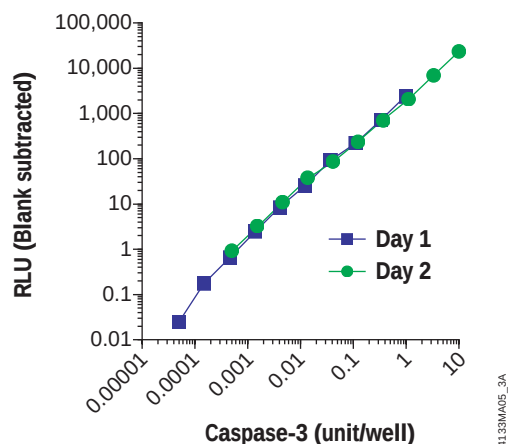


図2. Caspase-Glo™ 3/7 Assayのカスパーゼ濃度4オーダー以上にわたる直線性
異なる2日間、96ウェルプレートでCaspase-Glo™ 3/7 Assayを用いて精製カスパーゼ-3のタイトレーションを行った。発光は、Caspase-Glo™ Reagentを細胞に添加1時間後に測定した。グラフはCaspase-Glo™ 3/7 Assayのカスパーゼ濃度4オーダー以上にわたる直線性を示している。カスパーゼ1unitは (=0.07ngタンパク質)、1pmolの基質 (Ac-DEVD-pNA) を1分間に加水分解する量 (製造元のユニット定義)。各ポイントは4ウェルの平均値を示す。カスパーゼ無しのブランクコントロールを全てのポイントから差し引いた。

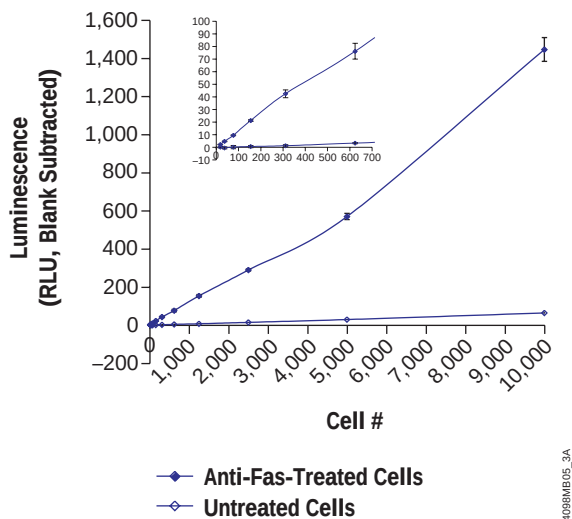


図3. 広範な細胞数で直線性を示すCaspase-Glo™ 3/7 Assayにより生成する発光
Jurkat細胞はアポトーシスを誘導するために抗Fas mAbで4.5時間処理したものと未処理のものを用意した。Caspase-Glo™ Reagentは96ウェルプレート中の細胞に直接添加し、1時間のインキュベーション後に測定した。各ポイントは4ウェルの平均値。“細胞無し”のブランクコントロール値を各ポイントから差し引いた。アッセイは広範な細胞数で直線性を示した。

Z'-Factor 分析が示す頑健なアッセイ

本アッセイは優れたZ'-Factor (アッセイのダイナミックレンジとデータの変動を比較することにより得られるアッセイの質を評価するために有用な統計的な値) を提示します。Z'-Factor値が 0.5~1.0であればアッセイ法が優れていることを示しています (4)。我々は、組換えカスパーゼ-3を用いてZ'-Factorを算出し、頑健なアッセイであることを示す0.92というZ'-Factor値を得ました (図5)。

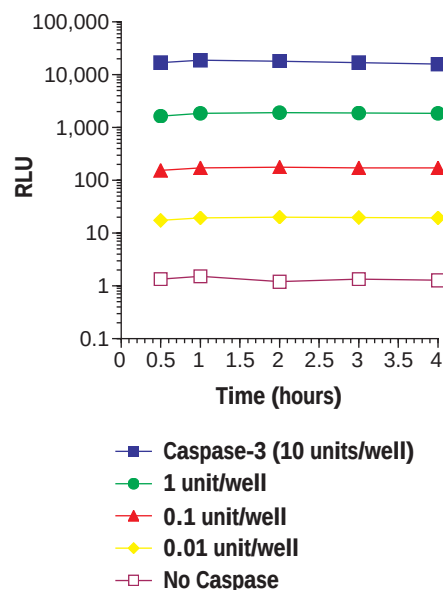


図4. 数時間安定なCaspase-Glo™ 3/7 Assayによる発光シグナル

Caspase-Glo™ 3/7 Assayを用いて精製カスパーゼ-3酵素のタイトレーションとアッセイを96ウェルプレートで行った。アッセイで得られた発光シグナルは数時間安定であった。カスパーゼ1unitは (=0.1ngタンパク質)、1pmolの基質 (Ac-DEVD-pNA) を1分間に加水分解する量。

アプリケーション：EC₅₀値およびIC₅₀値の決定

このアッセイの感度とシンプルな操作性はハイスループットスクリーニングに理想的です。アポトーシスの活性剤あるいはカスパーゼ阻害剤が同定できれば、このアッセイを用いてEC₅₀値およびIC₅₀値を簡単に算出することができます。図6では、HeLa細胞にアポトーシス誘導化合物スタウロsporinを用いた典型的なEC₅₀実験を示しました。Caspase-Glo™ 3/7 Assay で得られたEC₅₀値 200nMは、公表されている神経芽細胞腫に対するスタウロsporinのEC₅₀値 100nM(5)と同等でした。図7では、Caspase-Glo™ 3/7 Assayを用いてカスパーゼ-3阻害剤Ac-DEVD-CHOのIC₅₀を決定した実験を示しています。Ac-DEVD-CHOのIC₅₀は330pMでした。この阻害剤の公表されているKi値は230pMです (6)。

結論

Caspase-Glo™ 3/7 Assayは細胞または精製酵素抽出物でカスパーゼ-3/7活性を決定できる感度の高い方法を提供します。アッセイのためのシンプルなプロトコル (添加-混和-測定) およびマルチウェルフォーマットのためのデザインはハイスループットスクリーニングに理想的です。本アッセイはカスパーゼ-3/7の活性剤や阻害剤の特徴的な値であるEC₅₀やIC₅₀の決定に使用することができ、頑健なスクリーニングツールとしての利便性を示すZ'-factorも優れた値が得られます。また、安定なシグナルは、数多くのサンプルのバッチ処理に好適です。

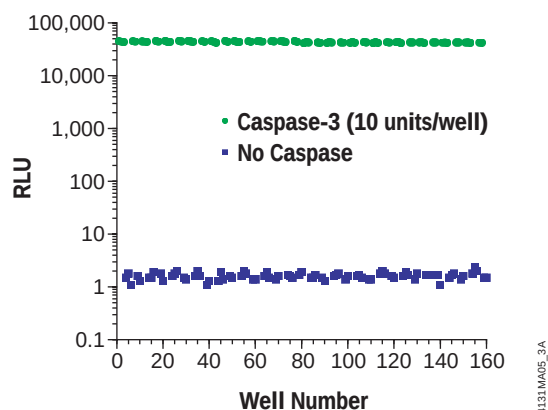


図5. Caspase-Glo™ 3/7 Assayが示す優れたZ'-factor値

2枚の96ウェルプレート（80ウェル/プレート）で組換えカスパーゼ-3（10unit/ウェル）およびカスパーゼ無しのコントロールからZ'-Factor 値を算出した。各プレートの半分のウェルを+カスパーゼ、残りの半分のウェルを-カスパーゼ（コントロール）とした。このアッセイでのZ'-Factorは0.92であった。カスパーゼ1unitは（= 0.1ngタンパク質）、1pmolの基質（Ac-DEVD-pNA）を1分間に加水分解する量（製造元のユニット定義）。

参考文献

1. Karvinen, J. et al. (2002) *J. Biomol. Screen.* **7**, 233–31.
2. Preaudat, M. et al. (2002) *J. Biomol. Screen.* **7**, 267–74.
3. Gopala-Krishnan, S.M. et al. (2002) *J. Biomol. Screen.* **7**, 317–23.
4. Zhang, J.H., Chung, T.D. and Oldenburg, K.R. (1999) *J. Biomol. Screening* **4**, 67–73.
5. Boix, J. et al. (1997) *Neuropharmacology* **36**, 811–21.
6. Garcia-Calvo, M. et al. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 32608–13.

プロトコール

- ◆ Caspase-Glo™ 3/7 Assay Technical Bulletin #TB323
(www.promega.com/tbs/tb323/tb323.html)

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Caspase-Glo™ 3/7 Assay	2.5ml	G8090	16,000
	10ml	G8091	60,000
	100ml	G8092	290,000

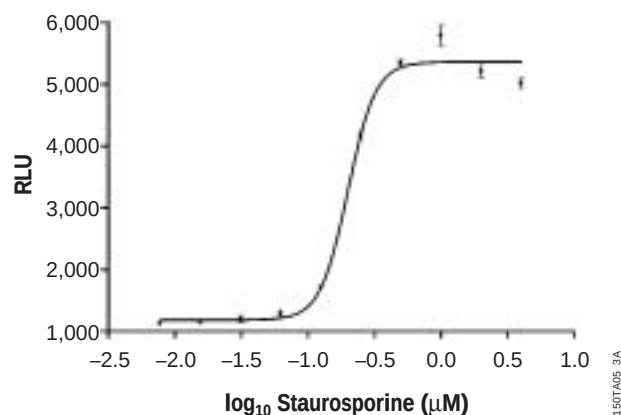


図6. Caspase-Glo™ 3/7 AssayによるEC50値の算出

96ウェルプレート内のHeLa細胞（10,000細胞/ウェル）をスタウロスポリンで4.5時間処理した。各ウェルにCaspase-Glo™ Reagentを添加し、1時間後にルミノメーターで測光した。データをもとにグラフを作成し、EC50値はGraphPad Prism® ソフトウェアにより得られた。

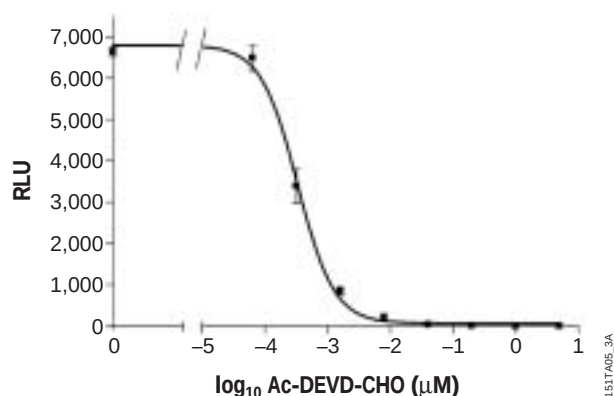


図7. Caspase-Glo™ 3/7 AssayによるIC50値の算出

96ウェルプレートでカスパーゼ-3（1unit/ウェル）を組合せてカスパーゼ-3阻害剤 Ac-DEVD-CHOのタイトレーションを行った。各ウェルにCaspase-Glo™ Reagentを添加し、1時間後にルミノメーターで測光した。データをもとにグラフを作成し、IC50値はGraphPad Prism® ソフトウェアにより得られた。