



迅速で高感度なATPベースの発光アッセイ法を用いた微生物の定量

By Frank Fan, Ph.D., Braeden Butler, B.S., Terry Riss, Ph.D., and Keith Wood, Ph.D., Promega Corporation

アブストラクト

BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assayは、ATPの定量をベースに生菌数を決定するためのシステムです。このシンプルなアッセイを用いれば約5分という短時間に結果が得られ、その優れた感度により、従来のO.D.測定法に比べ微生物の増殖を直ちに検出することが出来ます。また、本アッセイはシングルチューブおよびマルチウェルフォーマットに適用し、インジェクターの無いルミノメーターやCCDカメラで測光することができます。

添加、混和し、測定するだけ

このアッセイは、使用法がシンプルで培地中の菌体に1種類の試薬を直接添加するだけです。操作手順には培地の除去や菌体の洗浄などの手作業が無いので、複数のステップが必要な方法で起こりがちなエラーを低減することができます。また、シグナルが安定であるため、インジェクターは不要です。

アッセイプロトコルのダイアグラムを図1に示します。BacTiter-Glo™ Reagentを調製するには、凍結乾燥されたBacTiter-Glo™ SubstrateをBacTiter-Glo™ Bufferで溶解し、バックグラウンドとなる発光を低減させるために少なくとも15分間室温で平衡化します（Technical Bulletin #TM337 参照）。アッセイを行う場合は微生物培養液と等量の試薬を加え、混和した後に5分間インキュベーションします。生じた光はルミノメーターもしくはCCDカメラで検出します。

本アッセイの“添加 混和 測定”の形式は、抗菌剤の開発や一般的な微生物学の両方において理想的な選択肢です。

イントロダクション

ATPベースの微生物 検出/定量は、ルシフェラーゼ/ルシフェリンによる生物発光技術の中心的なアプリケーションを象徴しています。従来法では以下の2つのステップが必要です。1) 微生物のATPを遊離させるための溶解剤添加。2) 生物発光を開始させる検出試薬の添加。我々の開発したBacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assayでは、溶解剤にルシフェラーゼ/ルシフェリンが組み入れられているため、シングルステップで微生物細胞を高感度に検出することができます。

このアッセイシステムでは、菌体からのATP抽出と安定な“グロータイプ”の生物発光シグナル生成を同時に行うために耐熱性ルシフェラーゼ Ultra-Glo™ Recombinant Luciferaseを含む特殊な組成を用いています。歴史的に*Photinus pyralis*から精製したホタルルシフェラーゼがATPアッセイ用の試薬に利用されてきました(1-3)。しかし、この酵素は*in vitro*で中程度の安定性があるのみで、pHや界面活性剤などの因子に感受性を持っており、頑健でホモジニアスなATPアッセイでの使用には限界がありました。我々は、ATPアッセイのパフォーマンスを改善させる特性を選択するアプローチとして、他のホタル(*Photuris pennsylvanica*)の遺伝子を基に安定型ルシフェラーゼを開発しました(4)。さらに、様々な微生物細胞からATPを迅速で効率的に抽出する特殊な組成を開発しました。BacTiter-Glo™ Assayにおけるこれら2つの重要な要素の組み合わせは、培養菌体を用いたATPアッセイを行うためのホモジニアス/1液タイプシステムとしてデザインすることを可能にしました。この試薬は物質的に頑健で、高い感度と安定な発光アウトプットを提供します。

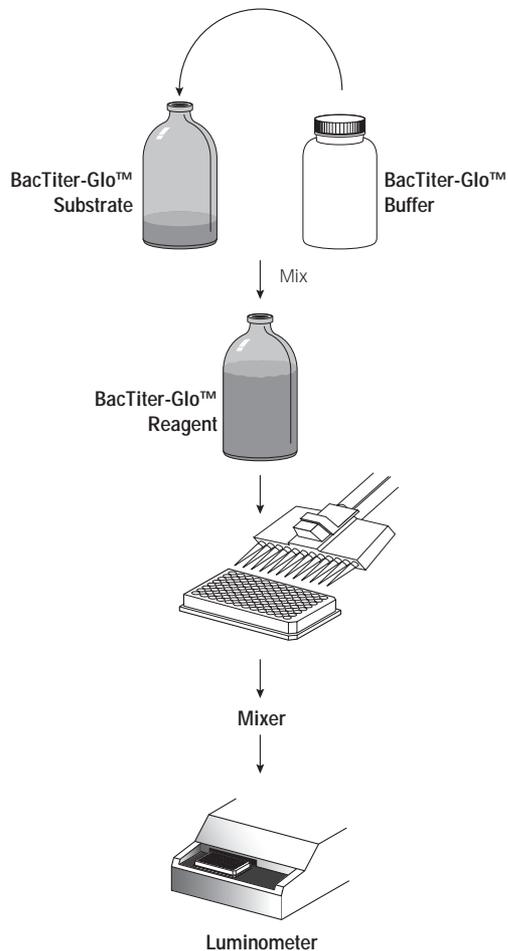


図1. BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assayのプロトコルダイアグラム
アッセイはシングルチューブアッセイと同様に図のようにマルチウェルプレートフォーマットにも最適

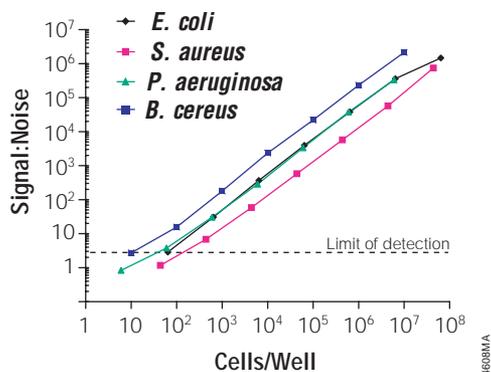


図2. 発光シグナルと菌数の相関性

4つの菌株 *Escherichia coli* (ATCC25922)、*Staphylococcus aureus* (ATCC25923)、*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) および *Bacillus cereus* (ATCC10987) を Mueller Hinton II (MH II) Broth (Technical Bulletin #TB337 参照) で37℃、一昼夜培養した。この培養液を新しいMH II Brothで50倍に希釈し、対数増殖期に達するまで数時間インキュベーションした。培養液サンプルは、96ウェルプレートでMH II Brothにより段階希釈した。アッセイはTechnical Bulletin #TB337に記載されるプロトコルに従って行った。調製したBacTiter-Glo™ Reagentは感度を上げるために1.5時間室温で平衡化した。発光測定にはVeritas™ Microplate Luminometer (カタログ番号 E6501) を用いた。シグナルの値は各測定トリプレートの平均で表した。菌数はLB寒天プレート上のコロニー形成ユニットのプレートカウンティングにより決定した。シグナル/ノイズ比は以下の計算式で算出した ($S:N = \frac{\text{シグナルの平均値} - \text{バックグラウンド平均値}}{\text{バックグラウンドの標準偏差}}$)。 *E. coli*、*S. aureus*、*P. aeruginosa*、*B. cereus* を用いた本実験の検出限界はそれぞれ約40個、150個、70個、10個。

10個の細胞でも検出

BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assayは、高い感度と優れた直線性を有します (図2)。図2のデータでは本アッセイが10個の *Bacillus cereus* 菌でも検出できることを示しており、そのときのシグナルは菌体を含まない培地からのバックグラウンドシグナルの標準偏差の3倍よりも高いレベルでした。発光シグナルと菌数との相関性、直線性に優れ、概ね5桁以上のダイナミックレンジを有していました。BacTiter-Glo™ Assayの優れた感度とレンジにより、植菌直後の大腸菌の増殖をモニターすることもできます。

安定したシグナルにより向上した柔軟性

BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay (微生物の種類や培地に依存) は、通常30分を超える半減期を持つグロウタイプの発光シグナルを生成します (図3)。BacTiter-Glo™ Assayの持つ高い感度とシグナルの安定性は、ハイスループットスクリーニングへの適応性を高めます。これは優れたZ'-factor値により反映されています (Z'-factorはダイナミックレンジやデータのバラツキを基にアッセイ法の質を計る指標、5)。BacTiter-Glo™ AssayのZ'-factor値は、96ウェルフォーマットで0.9、384ウェルフォーマットで0.87です。

標準的な培地と溶剤との適応性

ルシフェラーゼ反応の化学的な条件は、酵素効率、ひいては発光強度やカイネティクスにも影響を与えます。我々は、BacTiter-Glo™ Assayが標準的な微生物用培地や汎用される有機溶剤に適応することを示しました (図4)。通常、陽イオン調整済みのMueller Hinton II Broth培地 (MH II Broth、BD Cat# 297963) を推奨しています。この培地はほとんどの好気性菌や通性嫌気性菌の増殖をサポートし、FDA (Food and Drug Administration) やNCCLS (National Committee for Clinical Laboratory) による食物検査や抗菌感受性試験に使用されています

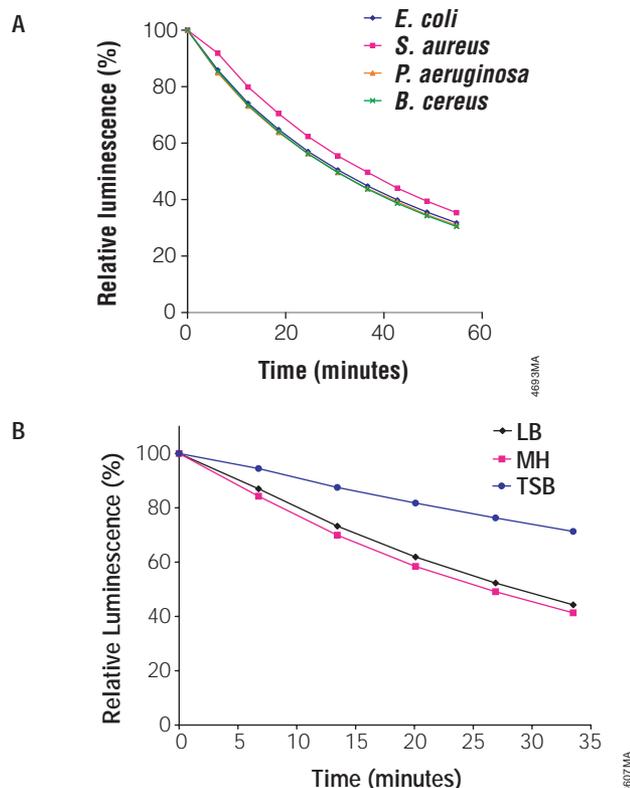


図3. BacTiter-Glo™ Assayにより生じるグロウタイプの発光シグナル

菌体の培養およびアッセイは図2と同様に行った。各アッセイでは約10⁴個の菌体を用いた。発光シグナルの安定性は長時間モニタリングし、発光の測定はVeritas™ Microplate Luminometer (カタログ番号E6501) を用いた。パネルA. 4つの異なる細菌 *E. coli*、*S. aureus*、*P. aeruginosa*、*B. cereus* は Mueller Hinton II Brothで培養し、アッセイした。パネルB. *E. coli* を3種類の培地、Luria-Bertani (LB)、Mueller Hinton II Broth (MH)、Trypticase Soy Broth (TSB) で培養し、アッセイした。

(6,7)。我々の実験では、この培地は低い発光バックグラウンド、バッチ間での優れた再現性を示していました。有機化合物の溶媒として汎用されるDMSOは、終濃度3%でテストした場合でも発光シグナルにほとんど影響を与えませんでした。

様々な微生物テスト

表1に示す様々な微生物の検出/定量にBacTiter-Glo™ Assayが利用できることを示しました。これらの微生物には、グラム陽性/陰性菌、酵母、菌類が含まれます。ランダムに集めたものに加え、抗菌剤の開発の標的となる病原菌、生物兵器防衛の対象となる病原菌の代替菌、モデル微生物などが含まれます。

結論

新しいBacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assayは、生菌をシンプル、高感度に定量、検出する方法です。このアッセイ法では微生物からのATP抽出・測定を1種類の試薬を用いて行います。同様の製品の中で、ホモジニアスなシングルステップが実施できる唯一のアッセイ法です。この“添加、混和、測定”のフォーマットは抗菌剤の発見および一般的な微生物学の両方で理想的な選択肢です。

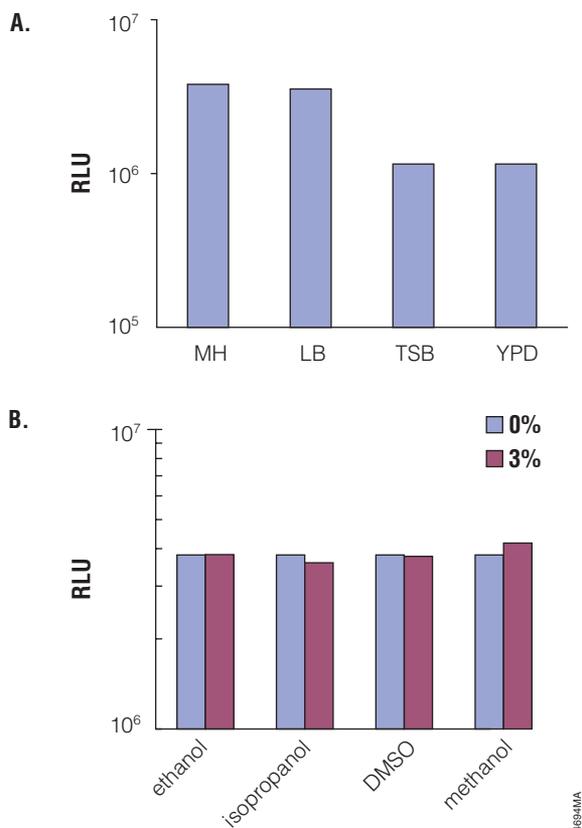


図4. BacTiter-Glo™ Assayの汎用される培地および溶剤との適応性
各アッセイでは約 1×10^{12} moleのATPを使用した。発光の測定はVeritas™ Microplate Luminometer (カタログ番号E6501)を用いた。パネルA. 発光は、4つの異なる培地、Mueller Hinton II Broth (MH)、Luria-Bertani (LB)、Trypticase Soy Broth (TSB)、Yeast peptone Dextrose (YPD)のサンプルから測定した。パネルB. 発光は、0%または3%の溶剤を含むMH培地のサンプルから測定した。

参考文献

- DeLuca, M.A. and McElroy, W.D. (1978) *Meth. Enzymol.* **57**, 3–15.
- McElroy, W.D. and DeLuca, M.A. (1983) *J. Applied Biochem.* **5**, 197–209.
- Lundin, A. and Thore, A. (1975) *Anal. Biochem.* **66**, 47–63.
- Hall, M.P. *et al.* (1998) Stabilization of firefly luciferase using directed evolution. In: *Bioluminescence and Chemiluminescence, Perspectives for the 21st Century*. Roda, A. *et al.* (eds) New York: John Wiley & Sons., 392–5.
- Zhang, J.-H., Chung, T.D.Y. and Oldenburg, K.F. (1999) *J. Biomol. Screen.* **4**, 67–73.
- Association of Official Analytical Chemists. (1995) *Bacteriological Analytical Manual*, 8th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2000) *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard-Fifth edition M7-A5*. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.

表1. BacTiter-Glo™ Assay テストで成功した微生物

Gram-Bacteria	Gram+ Bacteria	Others
<i>Escherichia coli</i> ¹	<i>Staphylococcus aureus</i> ²	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ¹
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ²	<i>Enterococcus faecalis</i> ²	<i>Candida albicans</i> ²
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ²	
<i>Flavobacterium okeanokoites</i>	<i>Bacillus subtilis</i> ¹	
<i>Haemophilus influenzae</i> ²	<i>Bacillus cereus</i> ³	
<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	
<i>Salmonella typhimurium</i>		
<i>Yersinia enterocolitica</i> ³		
<i>Francisella philomiragia</i> ³		

1 モデル生物
2 薬剤開発
3 生物兵器

プロトコル

- ◆ BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay Technical Bulletin #TB337, Promega Corporation.
www.promega.com/tbs/tb337/tb337.html

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay	10ml	G8230	12,000
	10 × 10ml	G8231	50,000
	100ml	G8232	45,000
	10 × 100ml	G8233	330,000