



Perform Multiplexed Cell-Based Assays on Automated Platforms **Promega**

セルベースマルチアッセイの自動化

By Brad Larson, B.A., and Tracy Worzella, M.S., Promega Corporation

アブストラクト

1つのサンプルから複数のパラメーターを測定する要望に対して、今回我々が提示したデータは、複数の実験系でレポーターアッセイを含めたプロメガのセルベースアッセイが有効であることを示しました。マルチプレックス実験は、各種 検出機器を用いた様々な自動化プラットフォームで実施しました。

イントロダクション

今日のハイスループットスクリーニング施設は、既存の化学物質ライブラリーからより多種類の情報を収集するという要望の増加に直面しています。この試みは2つの異なる方法で完遂することができます。まず1つめは、アッセイを追加した一連の操作の実施が挙げられます。これを行うことで求めていたデータが得られるかもしれませんが、他方でスクリーニンググループによるセットアップや実施を要するアッセイ数の増加が薬剤開発を長期化する恐れもあります。さらにこの方式は、化合物、実験器具、組織培養に関わる消耗品を多く消費することでコストを上昇させる懸念もあります。2番目の魅力的な方法として、これらのアッセイをマルチプレックスフォーマットで行い、1つのサンプルで複数のパラメーターを評価するために複数の化学反応を利用する方法があります。この形態は、スクリーニングごとに2つ以上の情報を識別できるため、開発工程のスピードアップに貢献します。マルチプレックスの形式は、同一プレートで異なるアッセイを行うため、コストおよびデータの変動を抑えることができます。

スレポーターアッセイも実施しました。レポーター遺伝子の誘導はこれらマルチプレックス実験でアッセイしました。これら化学反応のコンビネーションの全ては、96、スタンダード384 (ST384)、低容量384 (LV384)、および1536ウェルフォーマットでテストしました。

方法

自動化液体分注

マルチプレックスアッセイはTecan Freedom EVO™ 200またはBeckman Coulter Biomek® FX ワークステーションを用いた96またはST384ウェルプレートフォーマットでテストしました (表1)。また、Deerac Fluidics™ Equator™ HTS低容量液体分注機を用いた自動化LV384および1536ウェルフォーマットでもテストしました (表1)。これらの実験に使用したFreedom EVO™ 200は、拡張可能な8チップ-リキッドハンドラーとセパレートタイプのプレートグリッパーを装着しました。Biomek® FXでは96チップ-ヘッドおよび統合されたプレートグリッパーを装備しました。両方の自動化プラットフォームは、96および384ウェルフォーマットアッセイを行っているスクリーニング施設で汎用されているものです。実験に使用したEquator™ HTS ワークステーションは非接触型の低容量8チップ液体分注機です。このロボットプラットフォームでは、分注時の勢い(力)と時間により細胞と試薬が十分に混和されるため、プレートシェーカーは不要です。Equator™ HTS ワークステーションは非接触型であるため、ウルトラHTS施設で要求される、高密度なLV384や1536ウェルプレートへの正確なピペティング、ディスポーザブルチップを使用することの無い短時間分注が可能です。

ハイスループット検出システム

Freedom EVO™ ワークステーションでアッセイプレート进行分析の際にはTecan GENios-Pro検出器を、Biomek® FX ワークステーションではBeckman Coulter DTX 880検出器を使用しました (表1)。GENios-Pro検出器は、蛍光強度、フラッシュまたはグロータイプ発光、デュアルカラー発光を含む広範な1次および2次スクリーニングアプリケーションに対応する“オールインワン”のシステムです。DTX 880もグロータイプ発光、デュアルカラー発光、蛍光などのアプリケーションに利用できる形態になっています。両方の検出器は6~384ウェルプレートの測定が可能で、それぞれの液体分注ワークステーションと一体化させることができます。

低容量、高密度LV384および1536ウェルテストプレートの分析にはBMG LABTECH PHERAstar Microplate Readerを用いました (表1)。PHERAstarは多機能なハイエンドリーダーで、蛍光、発光など複数の測定モードでプレートの分析を行うことができます。

シングルインジェクション、シグナル半減期の延長、優れた感度などの特性が融合することにより、自動化ハイスループットまたはウルトラハイスループットな液体分注操作や検出に理想的なシステムが実現します。

マルチプレックスフォーマットのアッセイを実施することは、ハイスループットスクリーニング施設にとって魅力的ではありますが、このような形態への移行に対する障害はまだ存在します。短い期限、リード化合物同定へのプレッシャーの増大により、多くのグループでは新しいアッセイ系を開発する時間も人手も存在しないのが現状です。このユニークなアッセイの組合せがうまく機能するサポートデータが無ければ、研究者は既存のアッセイデザインが不都合でも、それを継続せざるを得ません。今回、我々は以前にテストしたマニュアルフォーマットによるマルチプレックスアッセイ(1)が自動化ハイスループットまたはウルトラハイスループット形式でも良好に機能したことを実証しました。我々は、細胞を溶解しない細胞生存性アッセイCellTiter-Blue® Cell Viability Assay (蛍光法)と、細胞溶解性のアポトーシスアッセイApo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay (蛍光法)またはCaspase-Glo® 3/7 Assay (発光法)のマルチプレックスアッセイを実施しました。実験は、浮遊細胞株または付着細胞株の両方を用いました。また、我々は2種類の生細胞用レポーター基質EnduRen™ またはViviRen™ Live Cell Substrateと細胞溶解性のCellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assayを用いたマルチプレック

データと結果

細胞生存性アッセイとアポトーシスアッセイのマルチプレックス

CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (resazurin) を用いてApo-ONE® (蛍光法) またはCaspase-Glo® 3/7 (発光法) を組合せたマルチアッセイを行いました。アッセイには、浮遊細胞 (Jurkat) または付着細胞 (HEK293) を用いました。JurkatおよびHEK293細胞は、表2に示した形式、濃度でプレートに播種しました。Jurkat細胞は、Anti-FAS mAb 0~500ng/ml でタイトレーション (37 °C、5% CO₂) を行い、アポトーシスを誘導させました (データ未掲載)。また、HEK293細胞では、様々な濃度のスタウロスポリン (0~5μM) で16時間処理しました (37 °C、5% CO₂)。CellTiter-Blue® Reagentをインキュベーション終了2時間前に全てのテストプレートへ自動的に添加しました。蛍光ユニットを測定した後、様々な液体分注ワークステーションでApo-ONE® またはCaspase-Glo® 3/7 Reagentを添加しました。プレートは室温で1時間インキュベーションし、蛍光値または発光値を測定しました。

結果は、蛍光法または発光法によるアポトーシスアッセイと蛍光細胞生存アッセイの自動化マルチプレックス (96、ST384、LV384、1536ウェルフォーマット) が成功したことを示していました。図1は、1536ウェルフォーマットアッセイを実施して得られた典型的なデータです。96、ST384、LV384の各フォーマットで得られた同様のデータについてはPromega Technical Servicesで保有していますが、ここでは示していません。

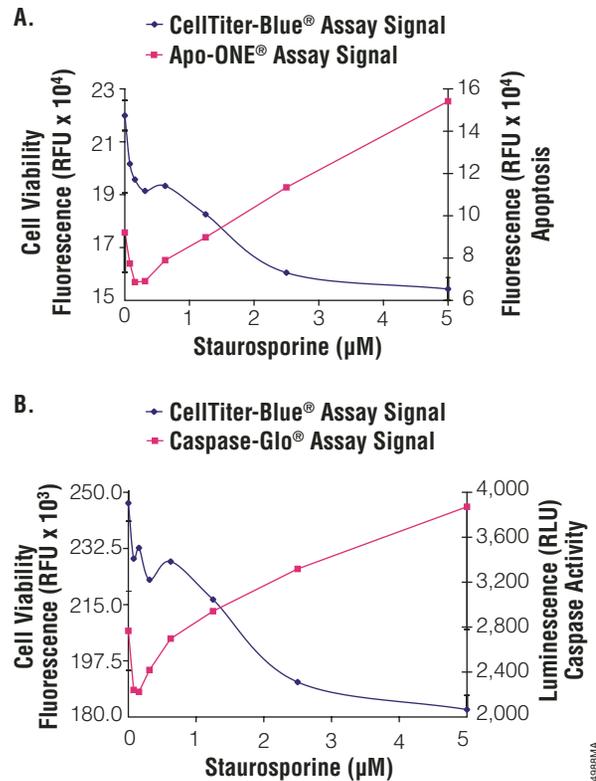


図1. 同一ウェル内で測定したカパーゼ活性の増加と細胞生存性の減少
HEK293細胞を1536プレートに播種し、37 °C、5% CO₂で10時間インキュベーションし付着させた。様々な濃度のスタウロスポリンで37 °C、5% CO₂、16時間処理し、アポトーシスを誘導した。インキュベーション終了2時間前にCellTiter-Blue® ReagentをEquator™ HTS workstationで添加した。Apo-ONE® Assayと組合せる場合には1X CellTiter-Blue® Reagentを、Caspase-Glo® 3/7 Assayと組合せる場合にはPBSで1:4に希釈したCellTiter-Blue® Reagentを使用した。蛍光ユニットを測定した後、Equator™ HTS workstationでApo-ONE™ またはCaspase-Glo® 3/7 Reagentを添加した。プレートを室温で1時間インキュベーションした後、蛍光または発光を測定した。測定は表1で示した検出機器を用いて行った。

表1. マルチプレックスセルベースアッセイ実験で使用した自動化プラットフォームと検出機器

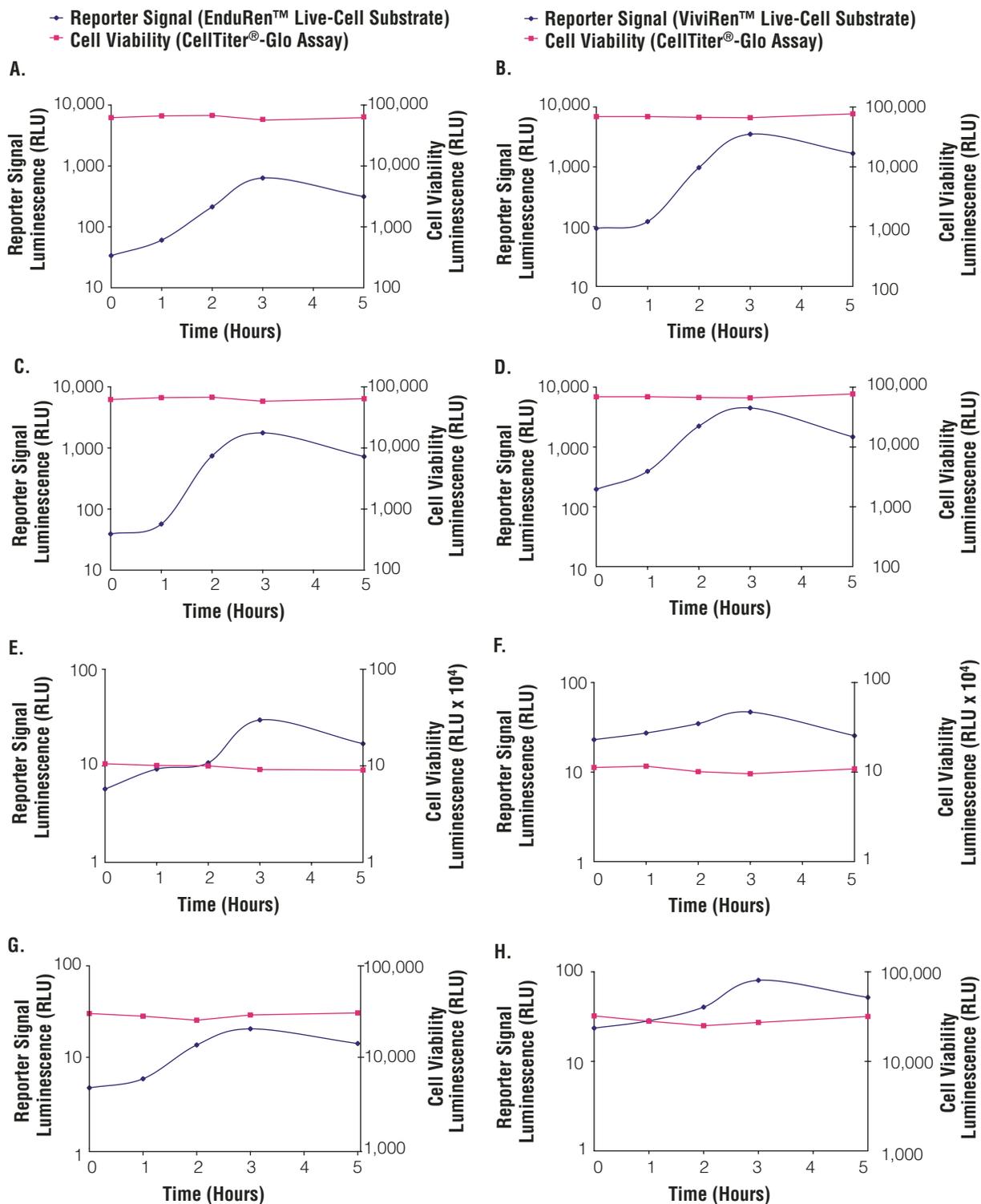
フォーマット	液体分注機	検出機器
96 and ST384	Tecan Freedom EVO™	GENios-Pro
96 and ST384	Beckman Coulter Biomek® FX	DTX 880
LV384 and 1536	Deerac Fluidics™ Equator™ HTS	BMG LABTECH PHERAstar

表2. マルチプレックス実験でウェルあたりに分注した細胞数とアッセイボリューム

細胞株	フォーマット	細胞数/ウェル	総アッセイボリューム
Jurkat	96	40,000	200μl
	384	10,000	50μl
	LV384	10,000	20μl
	1536	4,000	8μl
HEK293	96	20,000	200μl
	384	5,000	50μl
	LV384	12,000	20μl
	1536	4,000	8μl

生細胞用レポーターアッセイと細胞生存アッセイを用いた誘導実験

誘導性コンストラクト (CRE/CL1 hPEST Renilla Luciferase) (2)を安定にトランスフェクションしたHEK293細胞は、表2のリストに示された形式、濃度で播種しました。EnduRen™ Live Cell Substrate (セレンテラジン誘導体) を用いてレポーター活性を測定するテストプレートでは、誘導2時間前に細胞および培地へ終濃度60μMになるようにEnduRen™ Reagentを混和しました。CREは10μMプロテノールにより誘導し、プレートは37 °C、5% CO₂でインキュベーションしました。レポーター応答と細胞生存性は図2に示したタイムポイントで測定しました。ViviRen™ Live Cell Substrate (セレンテラジン誘導体) を用いたテストプレートでは、終濃度60μMになるようにこの基質をロボットで自動添加しました。EnduRen™またはViviRen™ を含むプレートのウミシタケルシフェラーゼ発光を測定後、細胞生存性を調べるためにCellTiter-Glo® Reagentを自動添加しました。2回目の発光測定ではATP含量および細胞数を測定しました。



4989MA

図2. 同一ウェル内でのEnduRen™ またはViviRen™ SubstrateによるCRE誘導および細胞生存性の連続モニタリング

誘導性CRE/CL1 hPEST *Renilla luciferase*コンストラクトを安定にトランスフェクションしたHEK293細胞 (2)を、96-, ST384-, LV384-, 1536ウェルフォーマットで播種し、37 °C、5% CO₂で10時間インキュベーションして付着させた。誘導2時間前に終濃度 60μMになるようにEnduRen™ Substrateを細胞/培地に混和した。CREを誘導するために全てのテストプレートに10μMイソプロテレノールを添加した。ViviRen™ Substrateは液体分注装置を用いて適切なテストプレートに終濃度60μMになるように添加した。誘導は0、1、2、3、5時間のタイムポイントでモニタリングした。各タイムポイントでウミシイタケの発光を測定し、液体分注装置でCellTiter®-Glo® Reagentを添加した。発光はATP含量および細胞数を測定するために2回測定した。全ての測定は表2に示した検出装置を用いた。上のグラフは以下に示す装置とフォーマットを用いて作製された。パネルA, B : 1536-ウェルフォーマット (Equator™ HTS workstation + PHERAstar detection instrument) ; パネルC, D : LV384-ウェルフォーマット (Equator™ HTS workstation + PHERAstar detection instrument) ; パネルE, F : ST384-ウェルフォーマット (Freedom EVO™ workstation + GENios-Pro detection instrument) ; パネルG, H : 96-ウェルフォーマット (Biomek® FX workstation + DTX 880 detection instrument)。

結果は、ウミシイタケルシフェラーゼ活性測定による長時間のレポーター応答を追跡し、その後、同じ実験ウェルで発光測定法を用いて細胞生存性を査定することができることを示しました（図2）。このアプリケーションにおいて、4つ全てのアッセイフォーマットで10 μ M イソプロテレノールによる3時間の処理がウミシイタケレポーターに最適でした。また、EnduRen™ よりもViviRen™ による発光が高い値を示していました。これはボリュームの減少と同様にシグナルも低下するミニチュア化したアッセイの場合に有効かもしれません。

まとめ

今回行った各実験は、様々なロボットプラットフォームでレポーターアッセイを含めたセルベースアッセイのマルチプレックスフォーマットが実施可能であることを示していました。従来型の96およびST384ウェルタイプと同様にミニチュア化したLV384および1536ウェルフォーマットで得られたデータは、手動で行った先の実験と一致していました。シングル-インジェクション、シグナル半減期の延長、優れた感度などの特性が融合することにより、自動化ハイスループットまたはウルトラハイスループットな液体分注操作や検出に理想的なシステムが実現します。

参考文献

1. Farfan, A. *et al.* (2004) *Cell Notes* **10**, 15-18.
2. Paguio, A. *et al.* (2005) *Promega Notes* **89**, 7-10.

プロトコル

- ◆ *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Technical Bulletin#TB288*
(www.promega.com/tbs/tb288/tb288.html)
- ◆ *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay Technical Bulletin #TB317*
(www.promega.com/tbs/tb317/tb317.html)
- ◆ *Caspase-Glo® 3/7 Assay Technical Bulletin#TB323*
(www.promega.com/tbs/tb323/tb323.html)
- ◆ *Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay Technical Bulletin #TB295*
(www.promega.com/tbs/tb295/tb295.html)
- ◆ *EnduRen™ Live Cell Substrate Technical Manual#TM244*
(www.promega.com/tbs/tm244/tm244.html)
- ◆ *ViviRen™ Live Cell Substrate Technical Manual#TM064*
(www.promega.com/tbs/tm064/tm064.html)

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	10 × 100ml	G7573	330,000
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	10 × 100ml	G8082	390,000
Caspase-Glo® 3/7 Assay	100ml	G8092	290,000
Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay	100ml	G7791	250,000
EnduRen™ Live Cell Substrate	34mg	E6485	1,040,000
ViviRen™ Live Cell Substrate	37mg	E6495	1,200,000