

Sensitive Detection of Reporter Gene Assay Results

GloMax™ Luminometerによる高感度な発光アッセイ

By Jason A. Bailey, Ph.D., Yuan-Wen Ge, Ph.D., And Debomoy K. Lahiri, Ph.D., Indiana University School of Medicine, Department of Psychiatry, Institute of Psychiatric Research, Indianapolis, In.

アブストラクト

GloMax™ Integrated Luminescence Systemは試薬、測定機器、ソフトウェア、プロトコルを1つに集約したサポートシステムです。GloMax™ Luminometerの有する高い感度と広いダイナミックレンジは最適な生物発光シグナルを測定する優れたツールとなります。

本稿ではGloMax™ Luminometerの発光測定に特化した優れた基本性能と特に限られたサンプル量で測定する際に発揮される高感度ルミノメーターの有用性と他社製品との違いについて説明します。

GloMax™ 96と20/20 Luminometers

アッセイシグナルとしての生物発光の利点を全て引き出すためには、ルミノメーターで活性を測定する必要があります。ルミノメーターには通常、光に対して鋭敏なフォトマルチプライヤーチューブ (PMT) が光を漏らさない測定ホールに設置されています。PMTは最大の感度と光の全波長をシグナルとして捉えるために光を生成するサンプルに近い場所に位置させます。多機能な測定装置は吸光度、蛍光、発光を測定することのできる柔軟性を提供しますが、このような機器は発光測定用にデザインされて分けではありません。異なるシグナルを測定するために必要なフィルターホイールやその他の組立部品が存在するために光学距離が長くなり、感度やダイナミックレンジが犠牲にされる場合があります。その結果、非常に明るいまは暗いサンプルは適切に測定されない場合があります。その点、GloMax™ Luminometersは操作しやすいインターフェイスを備えながら、できるだけ高品質な発光データを取得するという1つの目的のために設計されています。

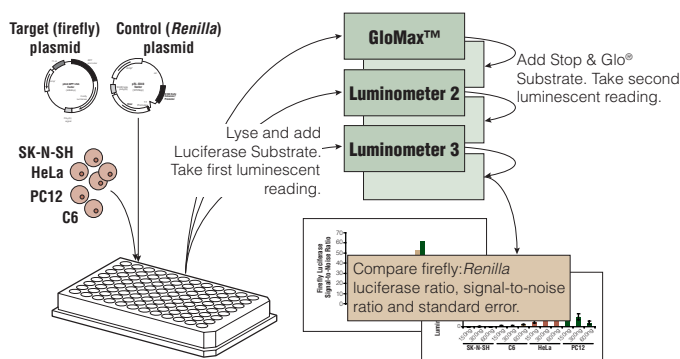


図1. 機器比較実験のフローチャート

96ウェルプレートに細胞を接種し、一晩かけて付着させ、実験用およびコントロール用のプラスミドをトランスフェクションした。24時間後、ホタルルシフェラーゼの基質を含むバッファーを添加し、3機種それぞれ4回測定した。ホタルルシフェラーゼ反応を停止させ、ウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定するためにStop&Glo® Reagentを添加、各機種ごとにさらに4回ずつ測定した。機器比較の主なチェック項目は、測定4回の標準誤差とシグナル/ノイズ比。さらにホタル/ウミシイタケルシフェラーゼ比を得ることで各細胞種でのプロモーター活性を比較することができた。

プロメガの生物発光アッセイの大部分は“添加-混和-測定”という簡便なフォーマットを特長としています。また、GloMax™ Luminometersはプロメガのアッセイ試薬による測定のためのプロトコルが予めインストールされているため、機器のプログラミングや最適化は不要です。しかし、柔軟性のあるインターフェイスにより研究者自身の実験に合わせて変更でき、要望に合わせることもできます。さらに、GloMax™ Luminometersのメンテナンスはシンプルで、インジェクターシステムのチューブは視認できるため、問題が起きる前に原因箇所を見つけ出すことができます。チューブ内の気泡やインジェクターのコンタミネーションが発生した場合、チップやチューブは研究者ご自身で簡単に取り換えることができます。

高感度ルミノメーターの有用性

初代培養した皮質細胞や細胞株から得た神経細胞群を複数の処理や条件でテストする場合、利用できる量（個数）には限界があります。そのため神経細胞種における遺伝子発現実験に使用するアッセイや機器には、限られた細胞数でも実施できるほど十分な感度が要求されます。脳内に発現する数千の発現遺伝子の機能を理解するには神経細胞やグリア細胞にDNAを導入し、発現させることが必須です。DNAを導入する様々なトランスフェクション法はそれぞれ細胞種や実験条件によって一長一短があります。トランスフェクション効率が低い場合やばらつきがあると、アッセイ感度や実験結果に直接影響します。

ここでは神経細胞およびグリア細胞を用いた新しいレポーター遺伝子アッセイを行い、測定装置の感度を評価するために、pGL3-Basic Vectorをトランスフェクションした細胞をDual-Glo™ Luciferase Assay Systemおよびルミノメーター3機種を用いて測定しました。

実験概要：一般的に使用される細胞株、SK-N-SH（ヒト神経芽腫細胞）、C6（マウスグリオーマ細胞）、PC12（ラット褐色細胞腫）およびHeLa（ヒト子宮頸癌細胞）をATCCより入手。培養プレートで異なる細胞密度で様々な量のDNAを用いて細胞株のトランスフェクション効率を比較。pGL3ホタルルシフェラーゼレポーターベクターに加え、ウミシイタケルシフェラーゼを発現するpRL-SV40コントロールベクターを細胞にコトランスフェクションし、両ルシフェラーゼ活性を測定し、ルミノメーター3機種（GloMax™ 96 Microplate Luminometer、Luminometer 2、Luminometer 3）でクロストークをチェック。各機種ごとに、同一サンプルの反復測定値のばらつきの指標である変動係数 (CV) およびシグナル-ノイズ比を算出した (図1)。

ルシフェラーゼレポーターの構成：1,235bpのRhesus アミロイド前駆体タンパク質 (APP) 遺伝子の5'側領域(4)、-1,131から転写開始領域+104までをpGL3-Basic Vector (カタログ番号 E1751) のホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子上流に挿入 (図2)。我々は以前にこの領域のプロモーター活性を異なるレポーターシステムでチェックし、さまざまな細胞株で適度な活性を有していることを確認(5)。強い恒常的な活性を持つプロモーターの下流にウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を持つpRL-SV40プラスミドは、トランスフェクション効率を決定するための内部標準として使用した。

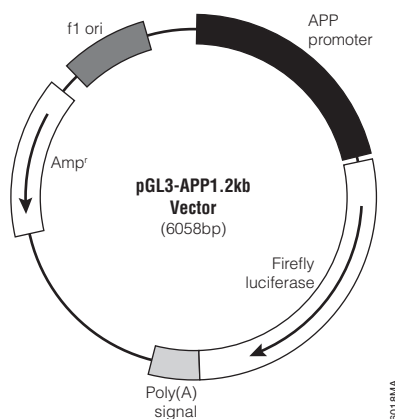


図2. *Rhesus* アミロイド全駆体タンパク質 (APP) プロモーターの1,235bpをpGL3-Basic Vectorのホタルルシフェラーゼ上流にクローニングした。

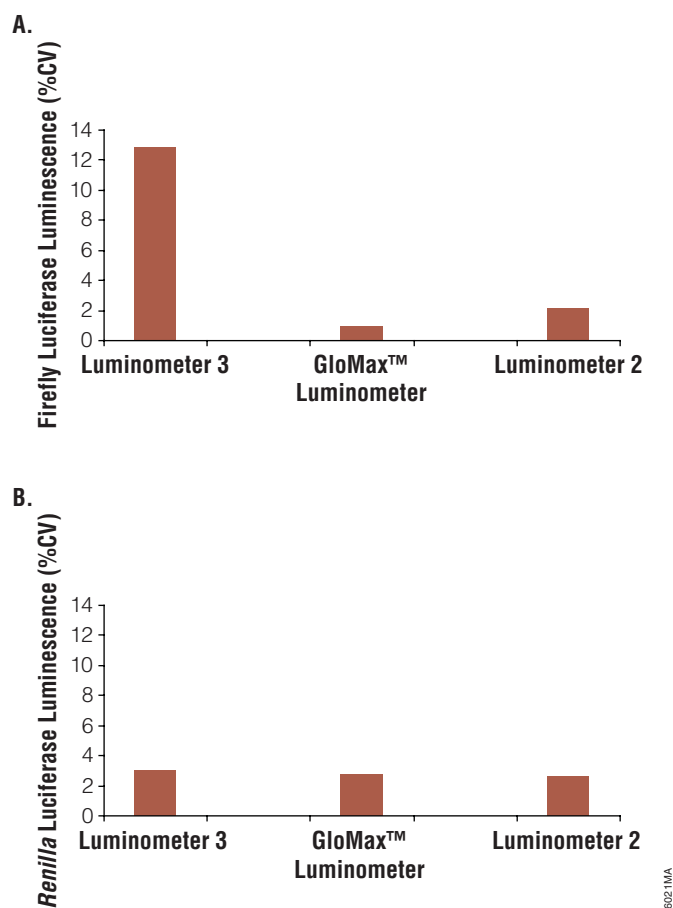


図3. ルミノメーター3機種の変動係数

パネルA. CV値が最も高いものはLuminometer 3で、最も低いものがGloMax™ 96 Luminometer。パネルB. ウミシイタケルシフェラーゼでは3機種ともほぼ同等のパフォーマンスを示した。絶対的なウミシイタケの発光は平均でホタルの約36倍であることから、これらの機器は非常に強いシグナルを測定する場合にはおおよそ同質のデータが得られる。

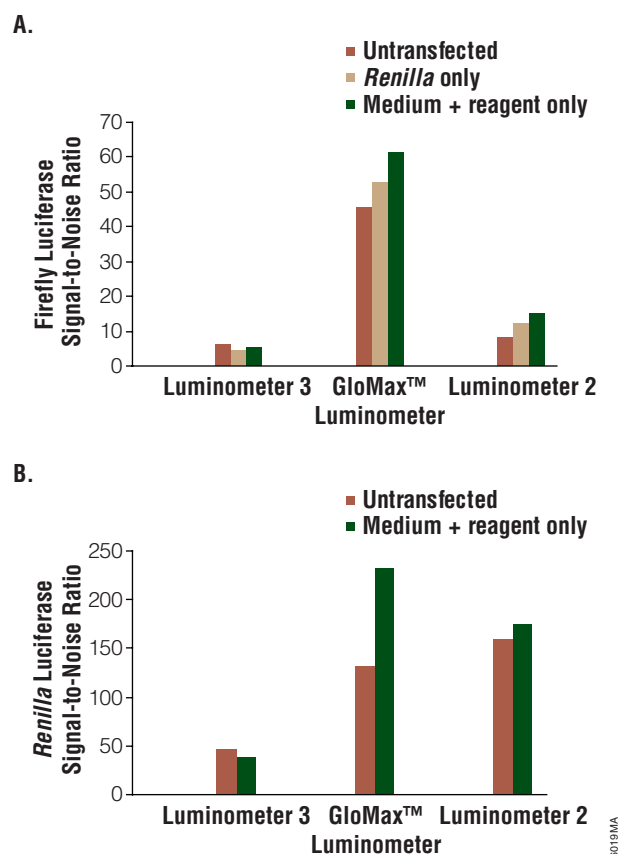


図4. シグナル/ノイズ比

パネルA. ホタルルシフェラーゼアッセイではGloMax™ 96 Luminometerで最も高いシグナル/ノイズ比が得られたが、Luminometer 2、Luminometer 3ではそれに比べて低い値であった。発光値は、ホタルルシフェラーゼベクターをトランスフェクションした細胞と3つの異なるバックグラウンド測定値（非トランスフェクション細胞、ウミシイタケルシフェラーゼのみをトランスフェクションした細胞、細胞を含まない培地と検出用試薬のみ）について比較した。発現したウミシイタケルシフェラーゼによる発光はホタルルシフェラーゼ検出試薬では検出されなかった。パネルB. ウミシイタケルシフェラーゼアッセイにおいては、Luminometer 2とGloMax™ 96 Luminometer は比較的同程度のパフォーマンスを示していたが、Luminometer 3は低いパフォーマンスしか示さなかった。

発光検出装置: ルミノメーターを比較するためにSK-N-SH細胞を96ウェルプレートに40,000個/ウェルの細胞密度で播種し、オーバーナイトで付着させた。これらの細胞はpGL3-APPおよびウミシイタケルシフェラーゼベクターでコトランスフェクションした。トランスフェクション24時間後、Dual-Glo™ Luciferase Assay System (カタログ番号E2920)でホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼの活性を測定した。ルシフェラーゼ検出試薬とともに10分間インキュベーションした後、各ルミノメーター3機種ごとに素早く4回連続（約1分間のインターバルを挟む）で測定した（図4）。Dual-Glo™ のシグナルは少なくとも2時間は持続するため、記載された測定所要時間に減衰するシグナルについては無視することができる。シグナル/ノイズ比を決定するためにいくつかのコントロールを含めた（培地のみ、未処理細胞、ウミシイタケルシフェラーゼベクターのみトランスフェクションした細胞）。

ルミノメーター3機種の検出感度比較

各機器はそれぞれ異なる絶対的測定レンジから生データを示すため、ホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼシグナル両方から得られた4連続の測定値から変動係数 (CV) を算出しました。Luminometer 3のCV値はホタルのシグナルの場合、GloMax™ 96 Microplate LuminometerおよびLuminometer 2よりも顕著に高くなりましたが、ウミシイタケルシフェラーゼ測定の場合のCV値は全ての機種で同程度でした (図3)。2つのルシフェラーゼシグナルで現れたCV値の違いは、ウミシイタケルシフェラーゼ内部コントロールの活性が何倍も高いことが原因であると考えられました。

シグナル/ノイズ比は、“ノイズ”として設定したいいくつかのコントロール条件を用いてホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼアッセイ両方について算出しました (図4)。ホタルルシフェラーゼシグナルの測定では、Luminometer 2、Luminometer 3で同等でしたが、GloMax™ 96 Microplate Luminometerよりも非常に低く抑えられていました。ウミシイタケルシフェラーゼの測定では、GloMax™ 96 Microplate Luminometer とLuminometer 2の両方の性能がLuminometer 3を大きく上回っていました (図4)。ウミシイタケルシフェラーゼレポーター活性の平均値は、APPプロモーターに制御されたホタルルシフェラーゼよりも36倍高い値を示しており、これが2つの異なるルシフェラーゼシグナルを測定する機器の性能差が現れた原因かもしません。

まとめ

機器比較の結果、GloMax™ 96 LuminometerとLuminometer 2は、アッセイのばらつきおよびシグナル/ノイズ比の両面においてLuminometer 3よりも優れたパフォーマンスを示しました。GloMax™ 96 Luminometer とLuminometer 2は、ウミシイタケルコントロールからのシグナルを測定する場合のデータの質はおおよそ同レベルでしたが、APPプロモーター制御下のホタルルシフェラーゼシグナルの場合はGloMax™ 96 Luminometerで得られたシグナル/ノイズ比が顕著に優れていました。ホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼの測定より得たシグナル/ノイズ比に認められた差異は、生データの違いによるものであると考えられました。ウミシイタケルシフェラーゼベクターには強力なプロモーターが含まれており、その結果、何倍もの高い生シグナルを生じました。しかし、それより活性の低いAPPプロモーターフラグメントは、研究室で一般的にみとめられる実験条件により近いものであり、本実験ではGloMax™ 96 Luminometer がテストした3つの機種で最も優れたパフォーマンスを示すことが分かりました。

我々は、GloMax™ 96 LuminometerとLuminometer 2により得られたデータの質はLuminometer 3よりも非常に優れており、特にGloMax™ 96 Luminometerは弱いシグナル強度において3機種の中で最良であると結論付けました。使い易さの点では、全ての機能がエクセルマクロにより直接コントロールでき、全てのデータがエクセルのスプレッドシートに記録できるLuminometer 3およびGloMax™ 96 Luminometerが優れていました。さらにGloMax™ 96 Luminometerでは、ダウンロード可能でプロメガの発光アッセイ用に事前に最適化されたソフトウェアのセッティングを利用することができます。Luminometer 2のソフトウェアでは、高レベルな統計分析などを含む広範囲で多様な機能を提供し、データを様々なファイル形式にエクスポートできますが、使い勝手は幾分低く、直接スプレッドシートにデータを記録できる利便性に欠けています。Luminometer 3は優れた多機能装置ですが、発光アッセイを行う場合には強いシグナルが得られる場合にのみ使用すべきです。これまでに言及した全ての点を考慮するとGloMax™ 96 Luminometer が3つの中で最も優れていると考えられます。本稿で使用した条件で、

中程度の活性を有するプロモーターにより駆動するルシフェラーゼレポーター遺伝子を検出することができました。特筆すべき点として、本実験がハイスループットシステムでトランスフェクション24時間後、25,000個の細胞を用いて150ngという少量のDNAで実施できた点です。

参考文献

1. Wasbourne, P. and McAllister, A.K. (2002) *Curr. Opin. Neurobiol.* **12**, 566-73.
2. Song, W. and Lahiri, D.K. (1995) *Nucl. Acids Res.* **23**, 3609-11.
3. Ghosh, C. *et al.* (2000) *Mol. Biol. Rep.* **27**, 113-21.
4. Song, W. and Lahiri, D.K. (1998) *Gene* **217**, 151-64.
5. Ge, Y-W. *et al.* (2004) *J. Neurochem.* **90**, 1432-44.

プロトコル

- ◆ Dual-Glo™ Luciferase Assay System Technical Manual #TM058
www.promega.com/tbs/tm058/tm058.html
- ◆ GloMax™ 96 Microplate Luminometer Technical Manual #TM278
www.promega.com/tbs/tm278/tm278.html
- ◆ pGL3 Luciferase Reporter Vectors Technical Manual #TM033
www.promega.com/tbs/tm033/tm033.html

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
GloMax™ 96 Microplate Luminometer	1 each	E6501	2,500,000
GloMax™ 20/20n Luminometer	1 each	E5311	1,100,000
Dual-Glo™ Luciferase Assay System	10 ml	E2920	30,000
pGL3-Basic Vector	20 µg	E1751	25,000
pRL-SV40 Vector	20 µg	E2231	13,000