

GloMax® -Multi Detection Systemを用いた同一ウェル内における細胞の健全性および生存性の連続測定

By Halina Zakowicz, Trista Schagat, David Yoder and Andrew Niles, Promega Corporation

アブストラクト

1つのマルチウェルプレートウェル内で複数のアッセイを同時に実施するマルチアッセイは、時間や費用を節約すると同時に実験的な理解をより深め、データの精度を向上させることができます。本稿では、プロメガのマルチアッセイが行える細胞ベースのアッセイシステムおよびGloMax® Multi Detection instrumentのアプリケーションについて説明します。

イントロダクション

生物学的研究を実施し、より生物学的に関連した情報を得るため、費用対効果の高いアッセイ法や試薬が望まれています。増加する実験費用に対して、プロメガでは費用効率に優れたソリューションを提供するために尽力しています。マルチアッセイを可能にする我々の幅広い細胞ベースのアッセイシステムは、費用、時間および貴重なサンプルを節約することができます。また、多用途に使い、高感度測定が可能な測定機器 GloMax®-Multi Detection System (カタログ番号 E7031) を提供しており、我々のアッセイシステムより得られる蛍光、発光シグナルの測定に使用することができます。我々は、広いダイナミックレンジを備えたGloMax®-Multi Detection Systemが蛍光法や発光法の細胞ベースシグナルの検出に最適であることを示しました (1, 2)。

細胞の生存性や毒性データは、刺激による作用や培養条件により変化します (図1)。研究者は、正確な生物学的情報を取得するために、細胞の健全性の指標として生存性、アポトーシス、細胞毒性 (ネクローシス) およびレポーター活性などをパラメーターとして用いています。これらのパラメーターのいくつかを統合あるいは多重化してアッセイすることにより、1回の実験からより多くの情報を得ることができます。

多くのプロメガのアッセイシステムは、ホモジニアスフォーマットであるため、培地の除去や細胞の洗浄を行わずに培養ウェルでアッセイを実施することができます。ホモジニアスフォーマットは、マルチウェルプレートの各ウェル内で蛍光と発光を組み合わせて測定することを可能にします。例えば、同じプレートのウェル内で細胞生存性の測定を蛍光アッセイで行った後、アポトーシスを評価するためにカスパーゼ活性を発光で測定することができます。

プロメガの細胞ベースのアッセイシステムのマルチアッセイ能力およびGloMax®-Multi Detection System instrumentの多機能性と感度を示すために、いくつかの蛍光および発光細胞ベースアッセイシステムのマルチアッセイを実施しました。これらの例は、1つのサンプルで複数の細胞パラメーターをモニタリングする能力を明らかにしました。

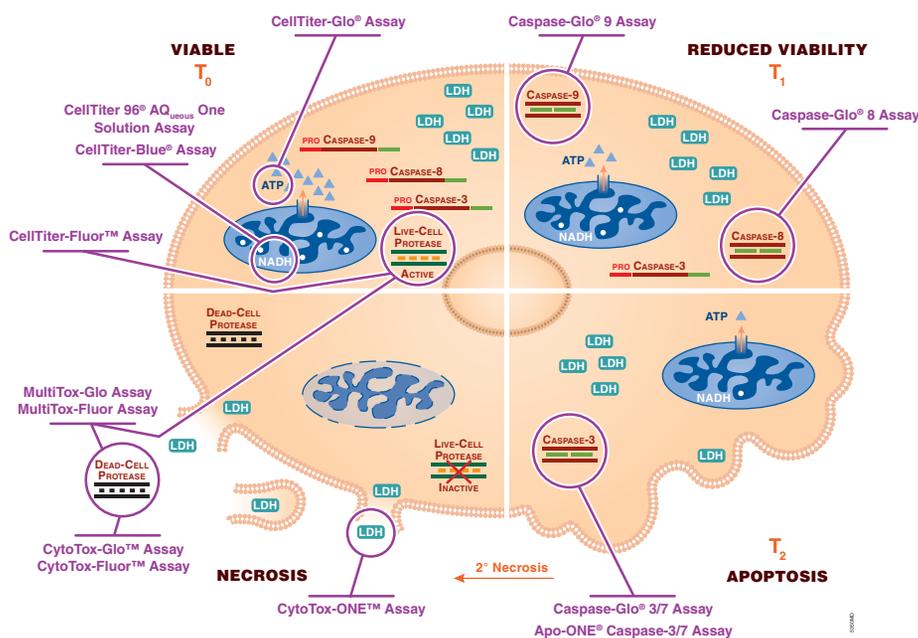


図1. 細胞の代謝的健全性および細胞毒性の研究を行うためのホモジニアスアッセイシステム

蛍光/発光マルチプレックス

多くのプロメガアッセイは、シンプルな蛍光アッセイ-発光アッセイによるマルチアッセイプロトコルで容易にマルチアッセイが行えるようにデザインされています (図2)。このプロトコルでは、濃度の高いアッセイ試薬を用いて蛍光アッセイを最初に行った後に発光アッセイを行います。アッセイに用いられるこのプロトコルは、表1に記載していますが、全ての蛍光/発光アッセイに最適というわけではありません。その他のプロメガアッセイに関するマルチアッセイのオプションに関する情報については、すでに公開されています (3)

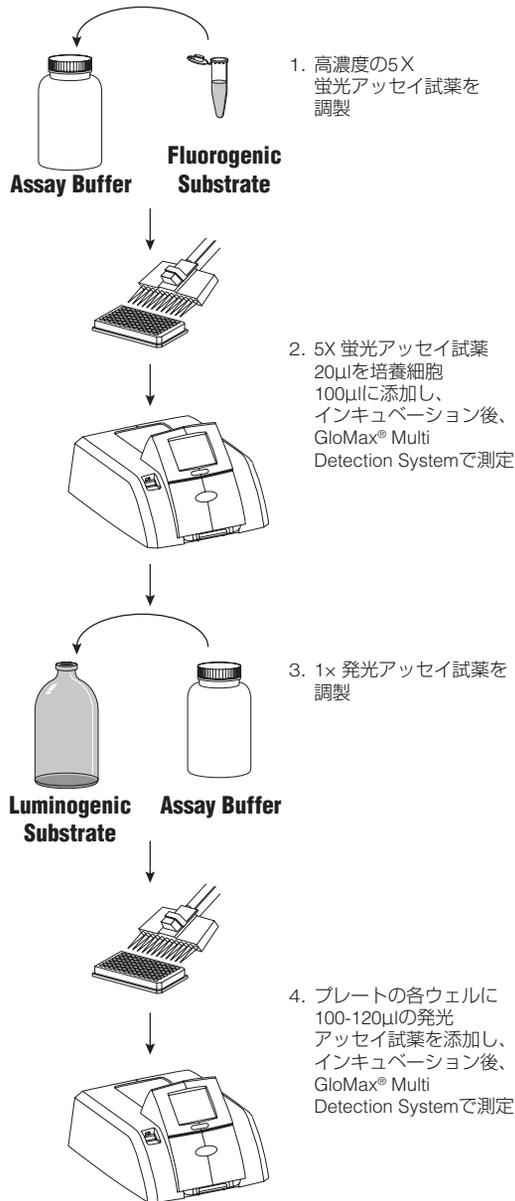


図2. 蛍光/発光マルチプレックス プロトコル
このシンプルなマルチアッセイプロトコルに適合するアッセイを表1に例示した。

細胞死のメカニズム

Caspase-Glo® 3/7 AssayとMultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assayとのマルチアッセイは、細胞毒性におけるアポトーシスの役割をより深く理解するための情報を提供します (4)。MultiTox-Fluor Assayでは、単一のアッセイで2つのプロテアーゼマーカー (細胞生存性とネクロシスのマーカー) の蛍光検出を利用します (5)。MultiTox-Fluor Assayでは、毒性を持つ酪酸ナトリウム濃度の増加に応じて、glycyl-phenylalanyl-amino-fluorocoumarin (GF-AFC) の切断による生細胞蛍光シグナルが、bis-alanyl-alanyl-phenylalanyl-rhodamine 110 (bis-AAF R110) 切断による蛍光死細胞シグナルと逆相関することが示されました (図3)。Caspase-Glo® 3/7 Assayでは、酪酸ナトリウム濃度増加にともなうカスパーゼ3/7活性の増加は、Z-DEVD-aminoluciferinの切断により検出されます。蛍光R110シグナルとの関連性は、アポトーシスが細胞毒性の原因となるメカニズムであることを示唆していました。

レポーターアッセイの補正

ONE-Glo™ Luciferase Assay SystemとCellTiter-Fluor™ Cell Viability Assayのマルチアッセイは、細胞の生存性を考慮した遺伝子発現の知見を与えてくれます。特定の濃度において、イオノマイシンとPMAは協調してNFAT遺伝子発現を刺激します。しかし、高濃度のイオノマイシンは細胞毒性をひき起こす結果となります。発光シグナル (細胞における転写/翻訳活性) は、イオノマイシンおよびPMAの存在下で初期的に増加し (*luc2P*遺伝子発現)、イオノマイシンが毒性を示す濃度まで増加するとそれに伴って低下します (図4)。毒性を示すイオノマイシン濃度まで達すると、GF-AFC切断による蛍光シグナル (生細胞由来) も減少します。これらのデータは、細胞の生存性の低下とレポーター (ルシフェラーゼ) 活性低下の一致が細胞毒性に起因することを直接的に示しました。もし、レポーター活性のみを測定していたら、細胞の健全性に対する化合物処理の影響が見過されていたかもしれません。

表1. プロメガの細胞生存性試験、アポトーシス、ネクロシスおよびレポーターアッセイのマルチアッセイ

1stアッセイ	2ndアッセイ	例
生存性: CellTiter-Fluor™ Fluorescent GF-AFC (400 nm/505 nm)	生存性: CellTiter-Glo® Luminescent アポトーシス: Caspase-Glo® 3/7, 8 or 9 Luminescent 毒性: CytoTox-Glo™ Luminescent	Figure 2 TB371, Figure 2 TB358, Figure 2
生存性: CytoTox-Fluor™ Fluorescent bis-AAF-R110 (485 nm/520 nm)	レポーター: ONE-Glo™, Bright-Glo™, Steady-Glo® Luminescent	Figure 2
生存性と毒性: MultiTox-Fluor Fluorescent bis-AAF-R110 (485 nm/520 nm) and GF-AFC (400 nm/505 nm)	生存性: CellTiter-Glo® Luminescent アポトーシス: Caspase-Glo® 3/7, 8 or 9 Luminescent レポーター: Steady-Glo®, Bright-Glo™, ONE-Glo™ Luminescent	Figure 2 Figure 2 Figure 2
	生存性: CellTiter-Glo® Luminescent	Figure 2
	生存性: CellTiter-Glo® Luminescent アポトーシス: Caspase-Glo® 3/7 Luminescent レポーター: Steady-Glo®, Bright-Glo™, ONE-Glo™ Luminescent	Figure 2 Figure 2 Figure 2

754TMA

- MultiTox-Fluor Assay (Viable) $EC_{50} = 2.6mM$
- MultiTox-Fluor Assay (Non-Viable) $EC_{50} = ND$
- Caspase-Glo® Assay $EC_{50} = 6mM$

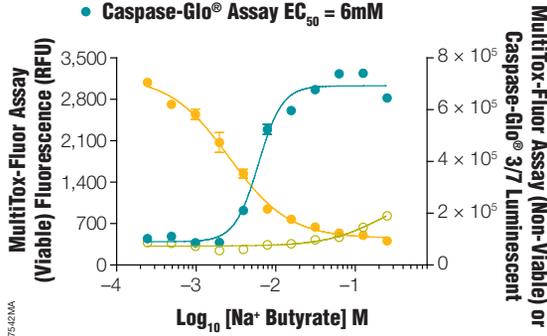


図3. MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity と Caspase-Glo® 3/7 Assay のマルチアッセイ

K562細胞 (5,000細胞/ウェル、100μ/ウェル) を、RPMI 1640/10% FBSに溶解したヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤 酪酸ナトリウムの希釈系列で処理した。48時間後、5倍濃度に調製したMultiTox-Fluor Reagentをウェルあたり20μl添加した。蛍光はGloMax®-Multi Detection System (AFC [405nm_{Ex}/495-505nm_{Em}])およびBlue [490nm_{Ex}/515-570nm_{Em}] optical kit) を使用して測定した。次に調製したCaspase-Glo® 3/7 Reagentを各ウェルに添加し (100μl/ウェル)、機器に搭載した発光モジュールで発光を測定した。

生存性試験の一致性

CellTiter-Fluor™ Cell Viability AssayとCellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assayのマルチアッセイでは、細胞生存性のための2つの異なるマーカーを測定することができます。CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assayでは、生細胞内に保存され構造的に存在するプロテアーゼ活性がベースになっており、このプロテアーゼ活性が細胞生存性のバイオマーカーとして機能します(4)。一方、CellTiter-Glo® Assayでは、細胞の健全性の指標として代謝マーカーであるATPを利用します(6)。GF-AFCの切断により生じる蛍光-生細胞シグナルは、17-AAG阻害剤の毒性濃度に達するに従い、細胞が産生するATPからの発光シグナル (細胞の健全性) と相関しました (図5)。これらのデータは、細胞の代謝的健全性と細胞生存性の一致を例証しています。

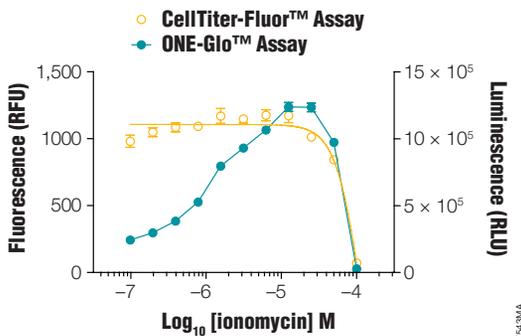


図4. CellTiter-Fluor™ Cell Viability およびONE-Glo™ Luciferase Assayによるマルチアッセイ

GloResponse™ NFAT-RE-*luc2P* HEK293(10,000個/ウェル、100μ/ウェル) は、DMEM/10% FBS (ハイグロマイシン BおよびNFAT転写活性の誘導剤として知られるPMAを含む) に溶解したイオノマイシンの段階希釈系列による処理を施した。37℃、6時間後、調製した5×濃度のCellTiter-Fluor™ Reagentを各ウェルに20μl添加した。37℃、30分間インキュベーションした後、GloMax®-Multi Detection System (AFC [405nm_{Ex}/495-505nm_{Em}] optical kit) で蛍光測定した。次に、調製したONE-Glo™ Reagent (100μl/ウェル) を添加し、機器に搭載した発光モジュールで発光を測定した。

生存試験と毒性試験のマルチアッセイ

MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assayを用いた生存性 (蛍光) と毒性 (発光) の連続測定により、1つのキットで細胞の健全性に関わる全容を示すことができます。イオノマイシン濃度の増加に応じて、切断されたGF-AFCからの蛍光シグナル (生細胞) は切断されたalanyl-alanyl-phenylalanyl-aminoluciferin (AAF-Glo™) からの発光シグナル (死細胞) と逆相関を示します (図6)。これらのデータは、1つの“オールインワン” マルチアッセイの中における細胞生存性と細胞毒性の間のレシオメトリックな一致を明示しています。

結論

プロメガの細胞ベースのアッセイによるマルチアッセイは時間、費用、試薬および貴重なサンプルを節約し、1つの実験で複数のデータセットを取得することができます。また、マルチアッセイは実験の反復の結果生じる環境的または人為的エラーを低減させることもできます。GloMax®-Multi Detection Systemは、蛍光および発光シグナルの測定に理想的なプラットフォームで、高い感度および広いダイナミックレンジを有しています。プロメガの細胞ベースアッセイとGloMax®-Multi Detection Systemの併用により、研究室での生産性が向上し、効率的になります。プロメガの細胞ベースのアッセイとGloMax®-Multi Detection Systemの詳細についてはwww.promega.com/applications/cellprolif/ および www.promega.com/gloxmulti/ をご覧ください。

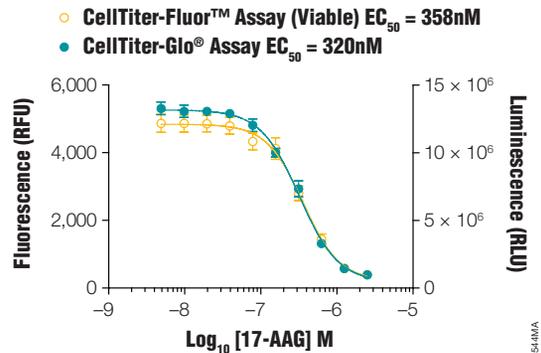


図5. CellTiter-Fluor™ Cell Viability とCellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assayによるマルチアッセイ

K562細胞(5,000個/ウェル、100μl/ウェル) は、RPMI 1640/10% FBSに溶解したヒートショックプロテイン 90 (Hsp90) 阻害剤 17-AAGの段階希釈系列で処理した。72時間後、調製した5×濃度のCellTiter-Fluor™ Reagentを各ウェルに20μl添加した。蛍光はGloMax®-Multi Detection System (AFC [405nm_{Ex}/495-505nm_{Em}] optical kit) で測定した。その後、調製したCellTiter-Glo® Reagent (100μl/ウェル) を各ウェルに加え、機器に搭載した発光モジュールで発光を測定した。

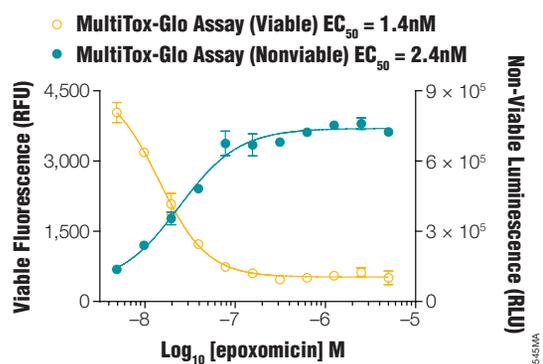


図6. MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assayからの蛍光および発光シグナルの測定

DU145細胞 (5,000個/ウェル, 100 μ l/ウェル) は、DMEM/10% FBSに溶解したプロテアソーム阻害剤エポキシマイシンの段階希釈系列で処理した。48時間後、MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay Technical Bulletin #TB358, Section IV.C. に従いMultiTox-Glo Reagentを調製、添加した。蛍光はGloMax®-Multi Detection System (AFC [405nm λ_{ex} /495-505nm λ_{em}] optical kit) で測定し、発光は機器に搭載した発光モジュールで測定した。

参考文献

1. Kopish, K. (2008) *Promega Notes* **98**, 3–5.
2. Zakowicz, H. *et al.* (2008) *Promega eNotes* online www.promega.com/enotes/applications/ap0085.htm.
3. Farfan, A. *et al.* (2004) *Cell Notes* **10**, 15–8.
4. Niles, A. *et al.* (2007) *Anal. Biochem.* **366**, 197–206.
5. Niles, A. *et al.* (2006) *Cell Notes* **15**, 11–5.
6. Hannah, R. *et al.* (2001) *Cell Notes* **2**, 11–3.

プロトコル

- ◆ MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay Technical Bulletin #TB348, Promega Corporation www.promega.com/tbs/tb348/tb348.html
- ◆ MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay Technical Bulletin #TB358, Promega Corporation www.promega.com/tbs/tb358/tb358.html
- ◆ Caspase-Glo® 3/7 Assay Technical Bulletin #TB323, Promega Corporation www.promega.com/tbs/tb323/tb323.html
- ◆ CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay Technical Bulletin #TB371, Promega Corporation www.promega.com/tbs/tb371/tb371.html
- ◆ CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Technical Bulletin #TB288, Promega Corporation www.promega.com/tbs/tb288/tb288.html
- ◆ ONE-Glo™ Luciferase Assay System Technical Manual, #TM292, Promega Corporation www.promega.com/tbs/tm292/tm292.html
- ◆ GloMax®-Multi Detection System Technical Manual #TM297, Promega Corporation www.promega.com/tbs/tm297/tm297.html

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Caspase-Glo® 3/7 Assay	10 ml	G8091	60,000
CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay	10 ml	G6080	15,000
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	10 ml	G7570	12,000
CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay	10 ml	G9260	15,000
CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay	10 ml	G9290	15,000
MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay	10 ml	G9200	27,000
MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay	10 ml	G9270	27,000
ONE-Glo™ Luciferase Assay System	10 ml	E6110	17,000
GloMax®-Multi Luminescence System			3,000,000
GloMax®-Multi Base Instrument	each	E7031	
GloMax®-Multi Luminescence Module	each	E7041	
GloMax®-Multi Fluorescence Module	each	E7051	850,000