



ハイスループットアプリケーションにおけるアポトーシスの迅速検出

Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assay

By Andrew Niles, M.S., Jean Humpal-Winter, M.S., Promega Corporation

本稿では強力かつ高感度な Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assay (カタログ番号 G7790, G7791) を用いてできる、数多くのアプリケーションの一部を紹介します。このアッセイは自由度が高いため、生命科学の研究者による実験からハイスループットの自動化プラットフォームを用いた実験までの広範囲でアッセイを実施できます。

調製の容易さと大きく向上した感度

プロメガは、従来のカスパーゼアッセイをサンプル調製ステップを除いて簡便化し、感度を上げるように改良しました。Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assay では、改良したカスパーゼ基質を含む溶解液と反応液の両方の機能を持つバッファーを添加するワンステップ方式を採用しています。このバッファーにより、最適化されたカスパーゼ-3/7 の活性を維持しながら迅速かつ効率的に細胞を溶解できます (図 1)。Z-DEVD-R110 基質は、Ac-DEVD-AMC または誘導物質蛍光体に対して相対的な蛍光値が非常に優れます (図 2)。このシステムのシグナル/ノイズ比は他のシステムよりも 40% 改良されています。

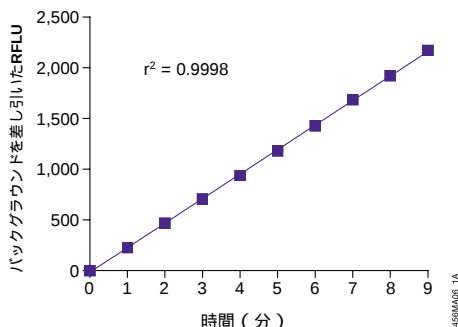


図1. このアッセイでは迅速かつ効率的な細胞溶解と最適化されたカスパーゼ活性が得られる

Homogeneous Caspase-3/7 Reagent の添加と穏やかな振とうによりほとんど即座に細胞は溶解される。カスパーゼ-3/7 による Z-DEVD-R110 基質の切断により生成される蛍光物質は、時間に比例して蓄積する。

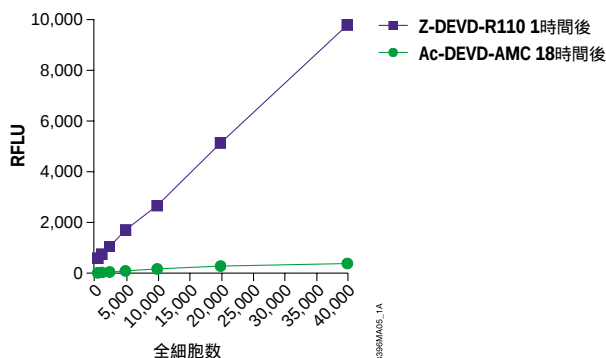


図2. Jurkat 細胞における Fas 受容体結合を介した 5 時間に渡るアポトーシスの誘導

細胞は 96 ウェルプレートに段階希釈した。Z-DEVD-R110 または Ac-DEVD-AMC のいずれかを含む Homogeneous Caspase-3/7 Reagent を細胞に添加し、室温でインキュベートした。Z-DEVD-R110 のデータは添加 1 時間後に、Ac-DEVD-AMC のデータは添加 18 時間後にそれぞれフルオロメーターで測定した。

誘導物質の2次スクリーニング

薬剤開発のプロトコルでは目的のモデルシステムに対して化学物質や生物学的試薬の最適なアポトーシス誘導および治療のための試薬量の範囲を決めなければなりません。このスクリーニングは、リード化合物がカスパーゼの誘導あるいは不活性化の特定の標準に適合するかどうかを明らかにするために必須です。研究者はこの情報を基に化合物が更なる開発や誘導物質の作製に役立つかどうかを決定します。図 3 はタンパク質キナーゼC (PKC) の阻害物質、スタウロsporinの有効量 (ED₅₀) を決定するためのデータを示しています。

このアッセイを用いれば、容易に阻害定数 (K_i) を決定することもできます。このモデル系では、精製した活性化型カスパーゼ-3 のブレイクに段階希釈した Ac-DEVD-CHO を添加し、1 時間に渡って阻害が平衡化するようにしました。その後、Homogeneous Caspase-3/7 Reagent を加え、阻害剤のそれぞれの希釈につきサンプルに残存するカスパーゼ活性を決定しました (データは Cell Notes No. 2 を参照)。

まとめ

プロメガでは精製したカスパーゼ溶液と同様に初代培養細胞、接着細胞、および浮遊細胞からカスパーゼ-3/7 活性を迅速、高感度、かつ効率的に検出するために簡易化したアッセイシステムを開発しました。このワンステップ型アッセイ試薬は、カスパーゼ活性を最適に維持する一方、サンプル細胞の迅速な溶解を可能にします。このアッセイはスケール調節が自在で、カスパーゼ活性に対する優れた感度を維持する一方、細胞ベースであるかあるいは精製した酵素であるかに関係無く、ハイスループットスクリーニングや、生命科学のアプリケーションに必要なアッセイスケールの微少化に役立てることができます。

(この記事の全文は Cell Notes No. 2でご覧いただけます。)

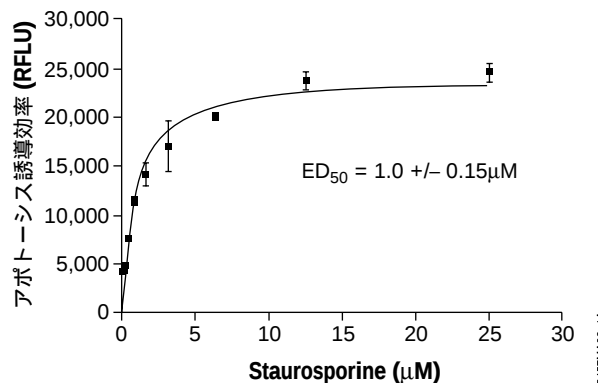


図3. HeLa 細胞におけるスタウロsporinのアポトーシス ED₅₀ の決定

段階希釈したスタウロsporinを培養液中に調製し、HeLa 細胞の単層に添加した。5 時間のインキュベーション後、Homogeneous Caspase-3/7 Reagent を添加し、さらに 2 時間インキュベートしたのちフルオロメーターで解析した。(詳細は Cell Notes No.2 を参照)