

高感度かつ迅速な細胞生存性の測定法

CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay

By Rita Hannah, Ph.D., Michael Beck, B.S., Richard Moravec, B.S., and Terry Riss, Ph.D. Promega Corporation

はじめに

CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay は、ルシフェラーゼ反応に必要なコファクターである ATP を、代謝活性を有する細胞の指標として利用しています。ルシフェラーゼ酵素は、 Mg^{2+} と ATP の存在下でルシフェリンに作用してオキシルシフェリンを生成し、エネルギーをルミネッセンスの形で放出します。ルシフェラーゼ反応には ATP が必要であるため、生じるルミネッセンスは、細胞内代謝活性の指標である ATP の存在量に比例します。本アッセイは、細胞生存性の測定法として他法より優れた点を複数そなえています。

添加、混合、測定だけの簡単操作

本アッセイは操作が簡単で、培地中の細胞に試薬をワンステップで直接添加するだけです。培地の除去や細胞の洗浄といった操作が不要なため、CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay の使用法は非常に簡単です。

アッセイの実施に際しては、凍結乾燥されている CellTiter-Glo™ Substrate を CellTiter-Glo™ Buffer に溶解して CellTiter-Glo™ Reagent を調製します。この Reagent を、細胞を培養した培地と同量添加します。2 分間混合し、10 分間のインキュベート後にプレート読み込みルミノメーターでルミネッセンスの放出量を検出します。ほかに、CCD カメラを使用してルミネッセンスを記録することもできます。

本アッセイの 1 つの特長は、pH 6.0 で反応が進行する点にあります。フェノールレッドを含有する培地に Reagent を添加すると、反応混合液はピンク色から黄色に変色します。色の変化によって CellTiter-Glo™ Reagent の添加を確認できるため、マルチウェルプレート内でピベティングする場合に便利です。

最大3桁にわたる感度と直線性

CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay は感度が良好で、最大 3 桁にわたって直線性を示します (図 1)。50 個の Jurkat 細胞に相当するシグナルは、細胞を含まない血清添加培地のバックグラウンドシグナルを標準偏差の 2 倍以上上回ります。 r^2 値は 0.99 であり、このことから本アッセイは 0 ~ 50,000 個の細胞数で直線性を示すことが明らかです。一部の細胞株では、わずか 4 個の細胞数でも検出することが可能です。このようなきわめて高い感度により、細胞株によってはアッセイの直線範囲は 4 桁まで広がります。プロメガで試験した接着細胞株と懸濁細胞株の間には、アッセイの直線性に差は認められていません。

CellTiter-Glo™ Assay の感度と再現性は、そのすぐれた Z 因子の値に反映されています。Z 因子はハイスループットアッセイ品質の無次元数で、アッセイのダイナミックレンジとデータのばらつきに基づいています。Z 因子が 1.0 に近いほど、すぐれたアッセイであると考えられます。CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay の Z 因子の値は 0.96 です。

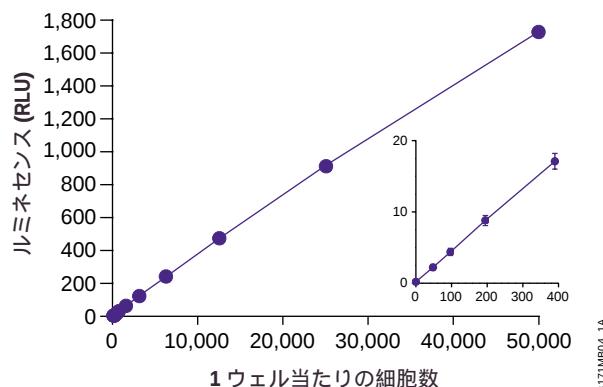


図 1. 細胞数は発光量と相関関係にある

Technical Bulletin #TB288 のプロトコールにしたがい、10% FBS 含有 RPMI 1640 培地に懸濁した Jurkat 細胞を 2 倍希釈系列で 96 ウェルプレートに分注した。10 分後、Dynex MLX Microtiter® プレートルミノメーターを使用してルミネッセンスを記録した。

長い半減期: 通常 5 時間以上

CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay は、“グロタイプ (長時間発光型)” の発光シグナルを生じ、半減期は細胞種、培地、および使用した血清に依存しますが通常 5 時間です (図 2)。従来より、ATP アッセイ用の試薬には、*Photinus pyralis* から精製したホタルルシフェラーゼが使用されてきました。しかし、*P. pyralis* 由来のルシフェラーゼは *in vitro* での安定性がそれほど高くなく、pH や界面活性剤などの環境因子に対して敏感です。このような特性は、強力な均質な ATP アッセイを開発するうえで妨げとなるものです。しかし、プロメガはさまざまな環境条件下で性能を高める特性を選別することにより、*Photuris pennsylvanica* 由来の安定型ホタルルシフェラーゼを開発しました。このような安定性の高い改変ルシフェラーゼが CellTiter-Glo™ Assay の強みのベースとなっています。

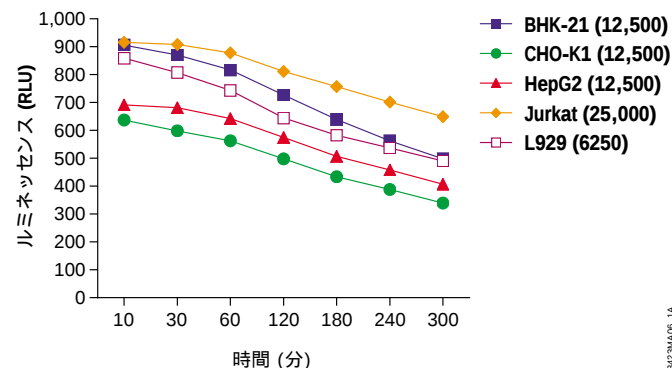


図 2. 発光の半減期が長いので、ハイスループットのバッチ処理が可能

5 種類の細胞株について、シグナルの安定性を示す。各細胞株の 1 ウェル当たりの細胞数は図中に示した。各ウェルの細胞懸濁液と等量の CellTiter-Glo™ Reagent を添加し、ルミネッセンスを 22 分経時的にモニターした。

内因性 ATPase からの保護

細胞死の過程では、ATP 量は代謝の停止に伴い急速に減少し、ATP は内因性の ATPase によって分解されます。CellTiter-Glo™ Reagent には、細胞溶解時の ATPase 活性を抑える阻害剤が含まれています。図 3 は、CellTiter-Glo™ Buffer に含まれる阻害剤による、ATPase からの保護効果を示しています。

フェノールレッドなどの添加剤がアッセイ性能に及ぼす影響は最小

フェノールレッドは多くの培地で pH 指示薬として使用されていますが、一部のルシフェラーゼアッセイでは、フェノールレッドの存在が有害な影響を及ぼします。CellTiter-Glo™ Assay に対するフェノールレッドの影響を評価するため、10% FBS 含有 RPMI 1640 培地 (フェノールレッド不含) のサンプルを 1μM ATP でスパイクし、さまざまな濃度のフェノールレッドを添加しました [1× または通常の使用濃度 (5.3g/l)、0.5×、および 2×]。フェノールレッドが本アッセイに及ぼす影響はきわめて軽微であり、活性の低下は 10% 未満で、半減期には変化は認められません (データは示しません)。被験物質の溶解に用いる溶媒も、ルシフェラーゼアッセイの結果に影響を及ぼす可能性があります。表 1 に、さまざまな溶媒が CellTiter-Glo™ Assay に及ぼす影響を示しました。ほとんどの溶媒は、アッセイの結果にほとんどまたはまったく影響を及ぼしません。

培地に添加する化学物質や血清も、ルシフェラーゼアッセイに影響する可能性があります。CellTiter-Glo™ Assay で試験した培地のうち、RPMI 1640 培地のいくつかのロットでは、アッセイ性能に対するマイナスの影響が認められました。その他の培地については、DPBS 中で調製した対照サンプルの活性と同等な活性が得られています。試験した 3 種類の血清は、ルシフェラーゼ反応に対してそれぞれ異なる影響を示しました。仔ウシ血清がもっとも強い阻害を示し、ウマ血清はほとんど影響を及ぼしません (図 4)。しかし、プロメガの経験では、RPMI 培地を除くほとんどの培地においては血清を添加しても反応の半減期に変化は認められていません (図 5)。

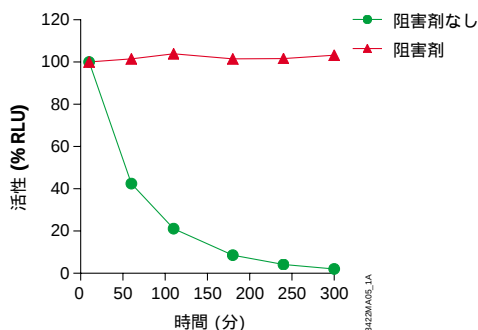


図 3. CellTiter™-Glo Reagent による ATPase 活性の阻害。

10% ウマ血清含有 DME/F-12 (1:1) 培地中の L929 細胞 1.5×10^5 cells/ml を、凍結融解を 3 ~ 4 回繰り返して細胞溶解液を調製し、反応に使用した。細胞溶解液を 2 つのプールに分割し、22 °C でインキュベートした。一方のプールには等量の 50mM HEPES (pH 7.5; 阻害剤なし) を添加し、もう一方には等量の CellTiter-Glo™ Buffer (阻害剤) を添加した。100μl の分画を 60 分ごとに計 10 回分取し、20μl の 5× CellTiter-Glo™ Substrate (ルシフェリン/ルシフェラーゼを混合したバッファー) を添加して混和し、発光量を測定した。測定は、各時点につき 4 連検体で行なった。

結論

CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay は、ATP の検出に基づく均質な長時間発光型の細胞生存性アッセイです。操作は迅速で、

反応の進行に長時間のインキュベーションは不要です。このアッセイは、[³H]-チミジン取り込みのような放射性アッセイからの脱却を図りたいとお考えのお客様に最適です。CellTiter-Glo™ Assay は、測定法に柔軟性を与え、ハイスループットフォーマット用として理想的です。(この記事の全文は Cell Notes No.2 でご覧いただけます。)

表 1. ルシフェラーゼ反応に対する溶媒の影響: DPBS のみの対照に対する RLU のパーセンテージ

溶剤	0.5%	1.0%	2.0%	4.0%	5.0%
DMSO	110	114	119	124	N.D.
DMF	104	98	106	96	N.D.
アセトニトリル	99	102	97	N.D.	N.D.
メチルピリドン	110	89	112	77	N.D.
エタノール	N.D.	100	N.D.	N.D.	100

N.D.: 該当データなし。(実験の詳細は Cell Notes No.2 をご覧ください。)

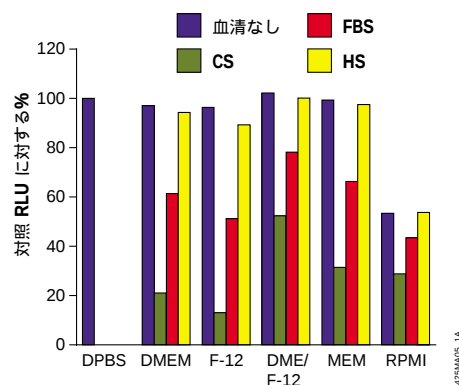


図 4. 培地への血清添加がルシフェラーゼ反応に及ぼす影響 CS、仔ウシ血清。HS、ウマ血清。FBS、ウシ胎児血清。(実験の詳細は Cell Notes No.2 をご覧ください。)

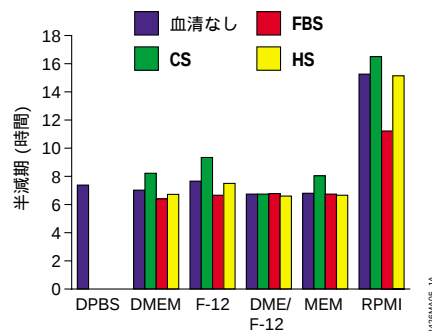


図 5. 培地への血清添加が反応半減期に及ぼす影響 CS、仔ウシ血清。HS、ウマ血清。FBS、ウシ胎児血清。(実験の詳細は Cell Notes No.2 をご覧ください。)

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
CellTiter-Glo™ Luminescent	10ml	G7570	12,000
Cell Viability Assay	10 × 10ml	G7571	50,000
	100ml	G7572	45,000
	10 × 100ml	G7573	330,000