



Dual-Glo™ Luciferase Assay System

By Erika Hawkins, M.Sc., Braeden Butler, B.S., Michael Beck, M.S., Michael O' Grady, M.S., Laurie Orr, B.S., and Keith Wood, Ph. D., Promega Corporation

要約

プロメガは、96/384ウェルプレートで哺乳動物細胞で発現するホタルおよびウミシイタケのルシフェラーゼをモニターする、ホモジニアスタイプのDual-Glo™ Luciferase Assay Systemを開発しました。Dual-Luciferase® Assay Systemとの違いは、発光試薬に細胞溶解作用も併せ持つ点と発光が数時間に渡り維持される点です。この新しいホモジニアスフォーマットにより、細胞溶解操作やインジェクターを用いた試薬の分注が不要になり、マルチウェルプレートでの処理がより簡便、迅速になりました。

新しいDual-Glo™ AssayはDLR™ Assayと同様に、同一サンプルでホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼを連続して測定できますが、さらにその発光シグナルのカイネティクスは有意に持続されました。

はじめに

レポーター遺伝子は、細胞内生理現象を迅速に評価するために広く用いられていますが(1,2)、1つのレポーターだけでは信頼性のある解釈を得るための十分なデータが得られるとは限りません。そのため、デュアルレポーターシステム、特に同じサンプルから連続してホタルとウミシイタケルシフェラーゼの活性を測定するDual-Luciferase® Reporter Assay System (DLR™ Assay) が汎用されています(3)。しかし96/384プレートで処理する場合、インジェクターの無いルミノメーターでの使用やスクリーニングには限界があります。

プロメガの新製品Dual-Glo™ Luciferase Assay SystemはDLR™ Assayの特長に加え、長時間発光カイネティクスとホモジニアスアッセイフォーマットを採用しています。長時間発光により、ルミノメーターで測光する前に、マルチウェルプレートの全てのサンプルに試薬を加え、複数枚重ね置くことも可能です。また、細胞溶解作用を持つ成分と発光試薬が一体になり、よりステップ数の少ない統合されたアッセイが可能になりました(図1参照)。さらに、培地を除去する必要がなく、培地中の細胞に直接試薬を加えることができます。

レポーター遺伝子は、細胞内で起きている遺伝子レベルの複雑な制御網から貴重な情報を与えてくれます。しかし、時として細胞内の複雑性は、不確定因子の影響を排除し、特定の生理的パスウェイだけを区別し、特徴づけることを困難にします。これらレポーター反応への干渉は、適当なレファレンス(通常 第二のレポーター)によってのみ明らかにできます。数多くの不確定因子により現れる干渉は、しばしば“ノイズ”として認識されています。また、干渉が実験法や生化学システムなどに起因する既知の影響である場合もあります。実験法による影響としては、マルチウェルプレートに見られる“エッジ-エフェクト”やトランスフェクション効率などが挙げられます。また、生化学システムが原因となる例としては、2つのパスウェイが交差する場合、例えば2つのレセプターパスウェイが1つの細胞内分子を利用する場合などです。また、細胞の生存性により遺伝子レベルのイベントをマスクしてしまふ場合があります。これは細胞毒性とダウンレギュレーションを区別する上で障害となります。

このような実験下でも、DLR™およびDual-Glo™を用いれば、レポーターデータから生物学的に有意な情報を迅速、簡便に得ることができます。Dual-Glo™は、マルチウェルプレートフォーマットで、膨大な数のサンプルのデュアルレポーター測定を加速させます。この試薬は、研究室での自動化、ハイスループットスクリーニングなどのアプリケーションに最適です。

ホモジニアス デュアルレポーターアッセイの開発

ホタルとウミシイタケの各ルシフェラーゼは、ともに簡単、高感度に定量するための最適なシステムを提供します。ともにmRNAが翻訳されると直ちに活性を持ち、哺乳動物細胞には存在しないため、内在性の酵素活性により干渉されません。デュアルレポーターシステムでは、進化の異なる生物に由来する酵素/化学反応を利用しているため、発光反応を区別することができます。

DLR™は、試薬2種類を連続して添加し、細胞ライセートに含まれる2つのレポーターを定量することができます。ライセートに加える最初の試薬は、ホタルルシフェラーゼ反応を開始させます。2番目に加える試薬はウミシイタケルシフェラーゼ反応を開始させるとともにホタルルシフェラーゼを消光します。その後、2番目の発光反応も停止します。DLR™の2つの試薬は、最大の感度を得るために最適化されています。

しかし、ルシフェラーゼは触媒作用により自己不活性化するため、生物発光シグナルは比較的短命です。ホタルルシフェラーゼ反応の場合、発光は約12~15分で50%減少します。ウミシイタケ反応の場合はより短く、3分以内に50%減少します。この反応カイネティクスは少数のサンプルをルーチンに定量する場合に適していますが、96ウェルまたは384ウェルプレートで分析する場合には問題となります。多くのルミノメーターはプレート全体を読み取るのに数分を必要とするため、インジェクターが必要です。発光を計測する前に試薬を全ウェルに分注する場合、最後のウェルが測定されるまでに許容できない発光の低下が起こります。96ウェルプレートの分析には、インジェクター搭載型ルミノメーターが最適ですが、サンプル処理量(スループット)が激減する場合があります。384ウェルプレート用のインジェクターでは、効果に疑問を持たざるを得ません。

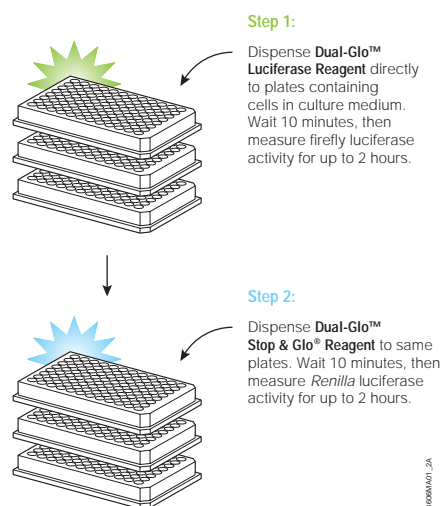


図1. シンプルなDual-Glo™ Luciferase Assay

もともとDLR™アッセイは、細胞ライセートの分析用にデザインされているので、サンプルの前処理はアッセイ前に行う必要があります。ライセートの調製は、各サンプルごとに培地を除去し、溶解剤で処理する必要があります。しかし、この操作はマルチウェルプレートでも少数のサンプルを扱う場合は可能ですが、数が多くなると非常に煩雑です。従って、DLR™アッセイは、自動化には適していません。ロボットシステムは、培地から細胞を分けたり、比較的短い反応カインティクスを実行することはできますが、ハードウェアの複雑化は、コストの増加とプロセスの機能不全を招く恐れがあります。

研究室での自動化は、レポーター分析を行う上で重要になってきており、Dual-Glo™は、DLR™アッセイの制限を解消できるようにデザインされています。特に96または384ウェルプレートで培養した哺乳動物細胞のハイスループット定量に最適です。このアッセイシステムにより、培地の除去や細胞の洗浄を行わずに、培地中の細胞に直接試薬を添加することができます。最初の定量試薬添加により細胞を溶解し、ホタルの生物発光が開始されます。2番目の試薬添加によりウミシタケの生物発光が始まり、ホタルの生物発光を10,000倍以上消光するので、ルシフェラーゼがウミシタケレポーターよりも100倍明るい場合でも、連続する反応間の発光の“持ち込み (bleed-through)”は事実上排除されます。2つのレポーターの発光カインティクスは、DLR™に比べ飛躍的に持続され、50%以下に消光するまでに2時間かかります (図2参照)。

Dual-Glo™ Assay のデザインは、デュアル-レポーターアッセイをマルチウェルプレートで行うために要求されるシンプルさを追求しています。持続された発光カインティクスにより、タイミングのズレをほとんど気にせずに試薬を一度にすべてのウェルに分注することができます。また、連続添加の場合でも、完了まで最大10分は必要ですが、相対発光値の違いは数%にすぎません。多くのプレートを定量するアプリケーションには、各プレートに1つ以上のコントロールウェルを割当てることにより、漸次変化するレポーター発光の値を補うことができます。この方法により、サンプルとコントロールの時間差による値の差異を最低限に抑え、異なるプレート間のサンプルを正確に比較することができます。1番目の試薬を加えた後でもウミシタケルシフェラーゼは安定なので、2番目の試薬を添加するタイミングは厳密ではありません。1番目の試薬を添加してから数時間後に2番目を添加することもできます。

Dual-Glo™ Assayの持続された生物発光カインティクスは、酵素の触媒ターンオーバーを減少させることにより可能となり、同時にアッセイ感度を低下させることにもなります。DLR™ Assayの高い触媒ターンオーバーは、優れた感度を示しますが、高い割合で不可避な自己不活性化が起こってしまいます。しかし、多くの場合、感度を抑えたDual-Glo™ Assayでも多くのアプリケーションで受け入れられています。通常、高いDLR™ Assayの感度は、一般的な実験系や少数のサンプルを用いる384プレートフォーマットで行う場合でも過剰気味です。

ウミシタケルシフェラーゼの測定感度は、自然発生的な基質の酸化による非酵素的なバックグラウンド発光に影響されます。このバックグラウンド発光は自己発光と呼ばれており、界面活性剤により形成される疎水の条件により増強されます。DLR™ Assayでは、特別にデザインされた細胞溶解剤が、界面活性剤による自己発光増進効果による影響を制限しています。しかし、細胞溶解作用をDual-Glo™ Assayのホモジニアスフォーマットに統合するためには、自己発光を起こさせやすい高濃度の界面活性剤が要求されます。この問題を解消するために、新しい組成を検討し、その結果自己発光を100倍以上抑えることができました (図3,4参照)。

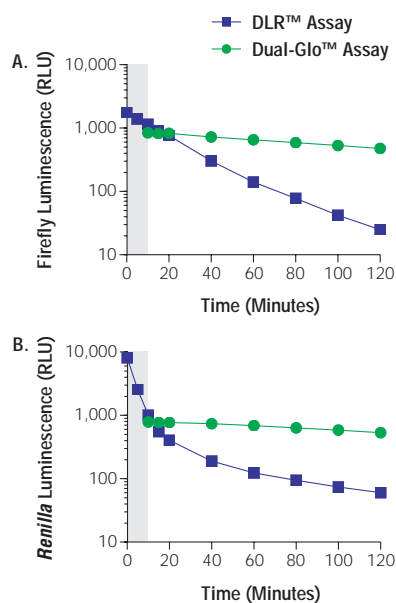


図2. Dual-Glo™とDLR™ Assayの生物発光カインティクス

ホタルおよびウミシタケルシフェラーゼを $1.67 \times 10^{-6} \text{ M}$ (+2mg/mlゼラチン)に希釈し、添付のマニュアル (#TM058および#TM040)に従い定量を行った。Dual-Glo™ Assayの場合、培地 (RPMI 1640)で各ルシフェラーゼを希釈し、試薬添加後10分間生物発光を測定した。DLR™ Assayの場合、Passive Lysis Buffer (カタログ番号 E 1941)で希釈した。生物発光の測定は試薬直後に開始した。測定は、両アッセイとも2時間かけて繰返し測定した。Dual-Glo™ Assayを使用した場合、ホタル (パネルA)およびウミシタケ (パネルB)の両ルシフェラーゼとも安定した発光が得られ、発光強度も同等であった。

データの信頼性向上

特異的な妨害イベントが支配している場合、その影響により実験結果の解釈を間違える場合があります。例えば、細胞損傷を遺伝子制御と誤解することなどです。特に、レポーターの新規アンタゴニストを同定するために、特異的なダウンレギュレーションを調べる場合など、レポーターの発現低下が細胞毒性と見分けがつかない場合があります。この状態は、第2のレポーター遺伝子を用いることにより解決することができます。

このような状況のモデルとして、Tet-Offプロモーターで制御されるウミシタケルシフェラーゼとCMVプロモーターで制御されるホタルルシフェラーゼの細胞内での発現を、デュアル-レポーターアッセイで観察しました (図4参照)。レポーター活性は、細胞にドキシサイクリンまたはG418抗生物質を添加後に測定しました。ドキシサイクリンは、Tet-Offプロモーターと組み合わせられたウミシタケルシフェラーゼ発現を特異的にダウンレギュレートすると予想されました (G418が細胞を殺すのとは異なり)。2つの化合物は、添加量に従いウミシタケルシフェラーゼ発光を減少させ、このシングルレポーターでは細胞死と特異的な遺伝子制御を区別することはできません。これに対して、ホタルルシフェラーゼを内部参照として用いることにより遺伝子上の反応と細胞死の区別が明瞭になりました。ドキシサイクリンによる減少はウミシタケ発光にのみ観察されたのに対して、G418による細胞死は両方のレポーター発光の減少として現れました。この違いはウミシタケとホタルの発光の比率として明確に示されました。

遺伝子上のレポーターの顕著な反応は、実験ノイズの統計的な不確定度によりマスクされることがあります。このノイズは、計測不能でしばしばコントロールできないイベントが原因となります。これらのイベントには、トランスフェクション効率のバラツキや添加する細胞数のバラツキ、温度、湿度、濃度勾配（例：エッジ効果）、インキュベーターの振動などがあります。標準偏差、変異係数、Z因子（5）など、精度を示す様々な測定基準は、定量法の信頼性におけるノイズの影響を評価する場合に使用されます。

ノイズの影響を抑えるために、第2のレポーターを内部標準として一般的に使用します（6）。ほとんどの非特異的なイベントは、実験レポーターとコントロールレポーターへ同様に影響を与えるため、その反応の比率は、それらの干渉に対してより頑強です。そのため、デュアルレポーターアッセイの比率は、通常どちらか一方のみのアッセイに較べより正確です。例えば、前述したモデルケースの場合、ウミシイタケルシフェラーゼ測定値の相対標準偏差の平均が13%であったのに対して、両レポーターの反応比率に対する値は6.5%でした（図4参照）。

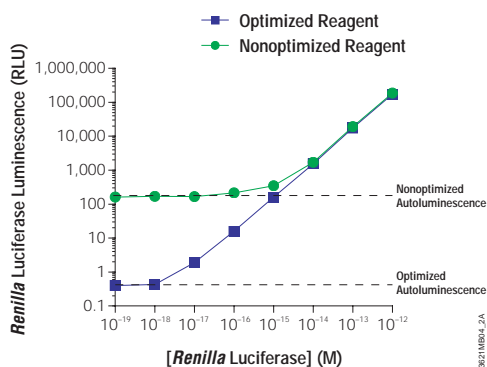


図3. Dual-Glo™ Assayのバックグラウンドの低減

ウミシイタケルシフェラーゼは1反応あたり $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{19}$ molesになるようにRPMI 1640培地で希釈し、完全に最適化されたDual-Glo™ Assayと自己発光をコントロールしないプロトタイプのアッセイを行った。アッセイには100 μ lサンプルを用い、22℃で試薬を添加し、10分後にTurner Designs Model 20e Luminometerで測光した。最適化されたアッセイでは検出限界が下がり、感度が向上した（点線は、各アッセイのバックグラウンド値の標準偏差）。

結論

デュアルレポーターを含む実験戦略は、信頼性があり、有意なデータを供給する傾向にあります。レポーター分析でも、より簡便に、より多くのサンプルを処理するためにマルチウェルプレートでのアッセイが行われてきています。これらのトレンドの最たるものがハイスループットスクリーニングであり、膨大な数のサンプルを定量分析します。Dual-Glo™ Assay Systemは、これらの要求をサポートするために開発されており、培地中の哺乳動物細胞からウミシイタケおよびホタルのルシフェラーゼ両方を定量するシンプルなホモジニアスアッセイを可能にします。

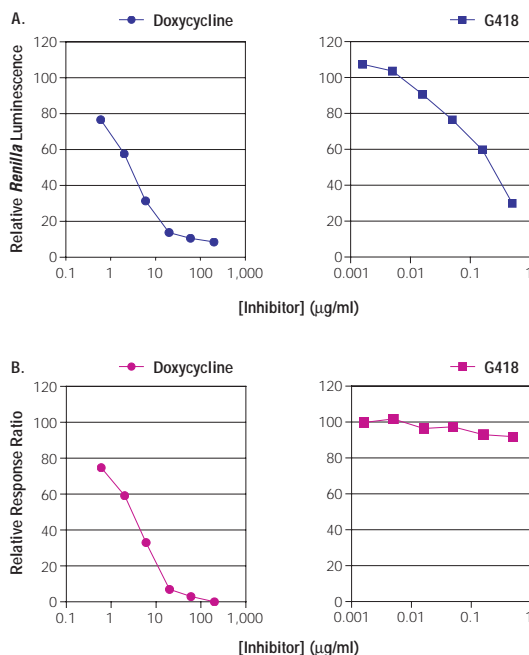


図4. 細胞毒性とダウンレギュレーションの分離

Tet-Off プロモーターで制御されるウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子およびCMVプロモーターで制御されるルシフェラーゼ遺伝子を、CHO細胞に一過性にトランスフェクションした。ウミシイタケルシフェラーゼのプロモーターに特異的な阻害剤（ドキシサイクリン）または細胞毒性試薬（抗生物質 G418）を細胞に表示量添加した。パネルA：ウミシイタケルシフェラーゼのみのシングルレポーターの場合、両阻害剤により同様の減少パターンを示した。Y軸は、阻害剤無添加の場合を100%とした場合の相対的ウミシイタケルシフェラーゼ発光。パネルB：デュアルレポーターシステムにより、遺伝子のダウンレギュレーションと細胞毒性を明瞭に区別することができることを示している。アウトプットは、サンプルおよび陽性・陰性コントロールをウミシイタケ発光とホタル発光の比率として測定した場合の相対反応比（RRR）として表した。相対反応比は、シングルレポーターのみの測定に比べ、より正確であった（パネルAの平均標準偏差が13%であるのに対し、パネルBは6.5%であった）。

$$RRR = \frac{[\text{サンプル} - \text{陰性コントロール}]}{[\text{陽性コントロール} - \text{陰性コントロール}]}$$

参考文献

1. Alam, J. and Cook, J.L. (1997) *Anal. Biochem* **188**, 245 -54.
2. Wood, K.V. (1991) In: *Bioluminescence and Chemiluminescence: Current Status*, Stanley, P. and Kricka, L., eds., John Wiley and Sons, Chichester, NY 543.
3. Sherf, B.A., Navarro, S.L., Hannah, R.R. and Wood, K.V. (1996) *Promega Notes* **57**, 2 -9.
4. Renilla Luciferase Assay System Technical Manual #TM055, Promega Corporation.
5. Zhang, J. et al. (1999) *J. Biomol. Screen* **4**, 67 -73.
6. Hannah, R.R., Jennens-Clough, M.L. and Wood, K.V. (1998) *Promega Notes* **65**, 9 -13.

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
Dual-Glo™ Luciferase Assay System	10ml	E2920	30,000
	100ml	E2940	240,000
	10 × 100ml	E2980	1,920,000