



Multiplexing Homogeneous Cell-Based Assays

ホモジニアスなセルベースアッセイを用いたマルチアッセイ

Abigail Farfan, M.A., Thomas Yeager, Ph.D., Rich Moravec, B.S., And Andrew Niles, M.S., Promega Corporation

アブストラクト

研究者は研究対象の生物学的プロセスをできるだけ深く理解するために、細胞から得られるデータを2種類以上望む場合があります。本稿では1つのサンプルを用いて細胞生存性試験、細胞毒性試験、アポトーシスおよびレポーターアッセイを組み合わせたプロトコルの概要を示します。

イントロダクション

生物医学研究におけるハイスループットに対する要望は、核酸の精製技術からレポーター分析を含むセルベースのアッセイにおよぶ全ての過程に影響を与えています。プロメガの次世代セルベースアッセイにはレポーター分析をはじめ細胞生存性、細胞毒性、アポトーシスのマーカーを測定する発光法および蛍光法が含まれます。研究者はこれらのツールを用いて、細胞が成長因子、サイトカイン、ホルモン、有糸分裂促進剤、放射線などのエフェクターやその他のシグナル伝達に関与するリガンドに対してどのように反応するかを調べることができます。これらのアッセイは、薬剤開発分野においては、動物実験や臨床試験の前段階に薬剤候補物質の毒性や有効性について事前にテストできる効果的な手段としての役割を持っています。

その中で、研究者は1つのサンプルから2種類以上のデータを必要とするケースがしばしば見受けられます。そのため単一のサンプルから2つ以上のパラメータについて分析できるマルチプレックスを行える機能が求められます。プロメガのセルベースアッセイは、培養細胞からの培地の除去、細胞の洗浄を伴わずに細胞を培養するプレートの各ウェルでそのまま実施できるホモジニアスアッセイ方式を採用しています。このホモジニアスフォーマットにより研究者はマルチアッセイを行うことができます(表1)。同一の培養ウェルで2種類以上のアッセイを行うマルチアッセイを行えば、内部標準を得ることができるため、反復実験の必要性を低減します。例えば、蛍光法による細胞毒性または細胞生存性試験を実施した後に同一サンプルを用いて発光法によるカスパーゼ活性またはレポーターアッセイを行うことができます。ま

た、同一培養ウェルで2つ以上のアッセイを行うマルチアッセイを行うと、時間、細胞サンプル、培養試薬さらに希少または高価なテスト化合物を節約することもできます。

プロメガはアポトーシスの分野ではカスパーゼ-3/7、-8、-9活性を蛍光または発光で測定する方法を提供しており、発光法または蛍光法の細胞生存性、細胞毒性またはレポーターアッセイとの並行使用やマルチアッセイも行えます。このアプローチにより、化合物処理が及ぼす細胞の生存性および細胞死メカニズムへの影響をより詳しく理解することが可能となります。

以降に掲載する表1-4は、セルベースアッセイの基本的なガイドラインを示しており、アッセイ系構築の際のデフォルト(初期設定)として参照ください。どのホモジニアスアッセイおよびマルチアッセイも固有の実験系を構築する上で最適化を要します。我々はサンプルを用いた個々のアッセイを実施するなどの適切なコントロール実験を行うことを強く推奨します。各アッセイごとのバックグラウンド、最適化、コントロールに関するさらに詳細な情報については、本稿の最後にリストアップされた技術資料に掲載されています。ご自身の実験に即した正しいセルベースアッセイを選ぶ際に役立つ完全な総説については参考文献1, 2および4を参照下さい。

細胞生存性、細胞毒性およびアポトーシスアッセイのマルチアッセイ

CellTiter-Blue® Cell Viability Assayは、生存細胞の還元能を特徴付けるレザズリンを用いた、培養中の生細胞数を決定するシステムです。レザズリンからレゾルフィンへの還元力は、代謝活性のある細胞数と比例します。CellTiter-Blue® AssayはCaspase-Glo™ 3/7 AssayまたはApo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assayとのマルチアッセイが可能です(表2)。

表1. マルチアッセイに使用できるプロメガのセルベースアッセイ

アッセイ	検出法	測定対象	マルチアッセイ (組み合わせ可能なアッセイ)
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Luminescent	ATP, viability	EnduRen™ Live Cell Substrate (<i>Renilla</i> reporter) CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay (fluorescent)
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	Fluorescent	Reducing Potential, viability	Caspase-Glo™ 3/7 Assay (luminescent) Apo-ONE® Homogeneous Caspase 3/7 Assay (fluorescent)
CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay	Fluorescent	LDH Release, cytotoxicity	Caspase-Glo™ 3/7 Assay (luminescent) Apo-ONE® Homogeneous Caspase 3/7 Assay (fluorescent)
Caspase-Glo™ 3/7 Assay	Luminescent	Caspase-3/7 Activity	CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (fluorescent) CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay (fluorescent)
Caspase-Glo™ 8 or Caspase-Glo™ 9 Assay	Luminescent	Caspase-8 or -9 Activity	Apo-ONE® Homogeneous Caspase 3/7 Assay (fluorescent)
Apo-ONE® Homogeneous Caspase 3/7 Assay	Fluorescent	Caspase 3/7 Activity	Caspase-Glo® 8 or Caspase-Glo® 9 Assays (luminescent) CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (fluorescent) CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay (fluorescent) EnduRen™ Live Cell Substrate (<i>Renilla</i> reporter)
EnduRen™ Live Cell Substrate	Luminescent	RenillaReporter Gene Activity	CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (luminescent) Apo-ONE® Homogeneous Caspase 3/7 Assay (fluorescent)

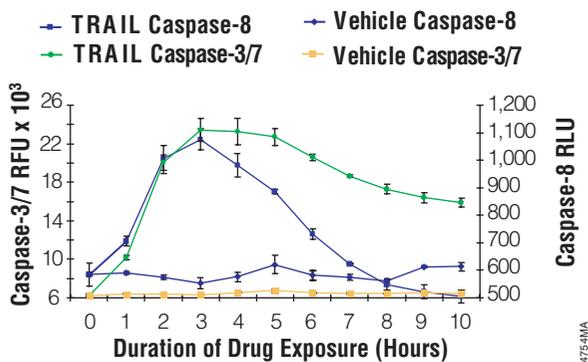


図1. 発光カスパーゼ-8アッセイと蛍光カスパーゼ3/7アッセイのマルチアッセイ
Jurkat 細胞を25,000個/ウェルで播種した。rTRAIL (Chemicon, 終濃度100ng/ml) またはビークコントロール (10% FBSを含むRPMI 1640) 50 μ lをタイムポイントごとの複製ウェルに1時間づつずらして10時間にわたって添加した。Caspase-Glo™ 8 Reagentはアッセイバッファーと基質を組み合わせで調製した。蛍光カスパーゼ3/7基質[(Z-DEVD) 2-R110]はCaspase-Glo™ Reagentに混和し、終濃度50 μ Mにした。調製した各試薬100 μ lを添加した後、60分間インキュベーションし、発光および蛍光を測定した。

CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay は、細胞膜の完全性が失われることにより、周囲の培地に放出される乳酸脱水素酵素 (LDH) を測定します。このアッセイを用いることにより、生細胞と死細胞が混在する細胞集団において、生存性を失った細胞の数を見積もることができます。CytoTox-ONE™ Reagentは生細胞にダメージを与えないため、培養中の細胞で直接実施することができます。表2および3ではCytoTox-ONE™ AssayとCaspase-Glo™ 3/7 Assay、CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability AssayまたはApo-ONE® Assayとを組み合わせたマルチアッセイの方法について記載されています。

CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assayは代謝活性のある細胞の指標となるATPを定量することにより培養中の生細胞数を決定します。このアッセイはEnduRen™ Live Cell Substrate (表4および図2) またはCytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay (表2および表3) とのマルチアッセイが行えます。

アポトーシスのマルチアッセイ

Caspase-Glo™ Assayは、発光前駆体カスパーゼ基質および特殊な安定化ルシフェラーゼを含む試薬 (特定のCaspase活性、ルシフェラーゼ活性および細胞溶解に最適化) を用いてCaspaseを測定します。"添加 混和 測定" の形式に従い11種類のCaspase-Glo™ Reagentを添加すると、細胞が溶解され、Caspaseにより基質が切断されます。この切断により、ルシフェラーゼにより消費されるアミノルシフェリンが遊離し、"グロー" タイプの発光シグナルが生じます。シグナルは、存在するCaspase活性に比例します。現在Caspase-Glo™ Assayシリーズでは、Caspase-3/7、Caspase-8およびCaspase-9 活性を測定するシステムがあります。これらのアッセイは細胞生存性または細胞毒性試験と組み合わせたマルチアッセイを行うことができます (表2)。また、Caspase-8または-9は、Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assayとのマルチアッセイが可能で、より多くのアポトーシスシグナリングに関する情報を提供します (図1、表2)。

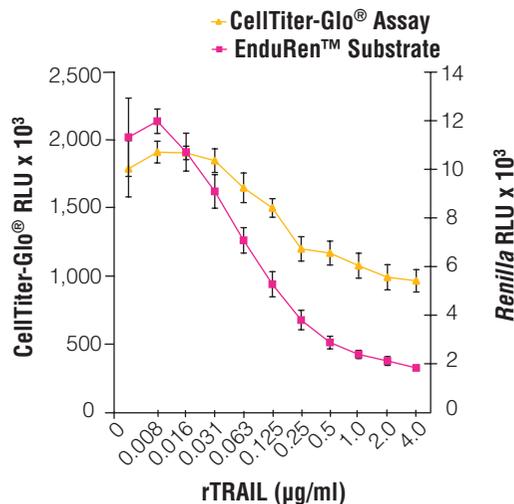


図2. ウミシイタケレポーターアッセイと発光細胞生存性試験とのマルチアッセイ
合成ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を安定に発現するHeLa細胞を96ウェルプレートに10,000個/ウェル播種した。10% FBSを含むDMEMで1,000倍に希釈したEnduRen™ Live Cell Substrate (カタログ番号 E6482) を全てのウェルに添加した。TRAIL protein (CalBiochem Cat#616375) を4 μ g/mlから2倍希釈系列で添加した細胞は16時間インキュベーションした後、アッセイした。ウミシイタケの発現は、インキュベーション後直ちにVeritas™ Microplate Luminometer (カタログ番号 E6521) で測定した。CellTiter-Glo™ Reagentは1:1量になるように各ウェルに添加し、Veritas™ Microplate Luminometerで測光した。

Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assayには、蛍光前駆体カスパーゼ-3/7基質および細胞溶解と酵素活性に最適化されたバッファーで構成されており、活性化Caspase-3、-7を測定します。バッファーは培養哺乳動物細胞を溶解し、最適なCaspase-3/7酵素活性を支えます。基質とバッファーを組み合わせで調製したApo-ONE® Caspase-3/7 Reagentをサンプルに直接添加します。Caspase-3/7酵素によりDEVDペプチド基質配列のアスパラギン酸残基C末端側が切断され、498nmの波長により励起されるとローダミン110が蛍光を生じます。生成した蛍光産物量は、サンプル中に存在する活性化Caspase-3/7量を示します。

細胞生存性試験またはアポトーシスアッセイをレポーターアッセイと組み合わせたマルチアッセイ

EnduRen™ Live Cell Substrateは細胞を破壊せずにアッセイを行えるため、長時間にわたって繰返しウミシイタケレポーター活性を測定でき、また、細胞生存性試験やアポトーシスアッセイおよびその他の細胞溶解アッセイとのマルチアッセイを行うことができます。レポーターアッセイと細胞生存性試験とのマルチアッセイを行うことにより、細胞生存性でレポーターアッセイのデータを補正することができるため、相対的な誤差を低下させることができます (図2、表4)。また、EnduRen™ Live Cell Substrateを用いれば、同一サンプルでCaspase活性とレポーター活性を測定することもできます (表4)。

ホモジニアスなセルベースアッセイを用いたマルチアッセイ

表2. プロメガのホモジニアス細胞生存性試験およびアポトーシスアッセイを組み合わせた連続マルチアッセイ (同一ウェル)

目的: 細胞生存性と細胞死メカニズムの決定 (CellTiter-Blue® Assay [生存性、蛍光法]とApo-ONE® Assay [カスパーゼ-3/7、蛍光法])

1. 96ウェルプレート (黒または白) で細胞を培養 (培地100µl) し、薬剤で処理。
2. 薬剤処理の最後の1-2時間の時点でCellTiter-Blue® Reagentを20µl/ウェル添加し、37 °Cでインキュベーション。
3. Technical Bulletin #TB317に従い蛍光を測定 (560Ex/590Em) し、細胞生存性を測定。
4. 等量 (120µl) のApo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Reagentを添加し、室温で1-4時間インキュベーション。
5. Technical Bulletin #TB295に従い蛍光を測定 (485Ex/527Em) し、アポトーシスのマーカーであるカスパーゼ活性を測定。

目的: 細胞生存性と細胞死メカニズムの決定 (CellTiter-Blue® Assay [生存性、蛍光法]とCaspase-Glo™ 3/7 Assay [カスパーゼ-3/7、発光法])

1. 96ウェルプレート (黒または白) で細胞を培養 (培地100µl) し、薬剤で処理。
2. 薬剤処理の最後の1-2時間の時点でCellTiter-Blue® Reagent (Dulbecco's PBSで4倍希釈)を20µl/ウェル添加し37 °Cでインキュベーション。
3. Technical Bulletin #TB317に従い蛍光を測定 (560Ex/590Em) し、細胞生存性を測定。
4. 等量 (120µl) のCaspase-Glo™ 3/7 Reagentを各ウェルに添加し、ルシフェラーゼが定常状態に達するまで室温で1時間インキュベーション。
5. Technical Bulletin #TB323に従い発光を測定し、アポトーシスのマーカーであるカスパーゼ活性を測定。

備考: マルチアッセイの場合、Caspase-Glo™ Reagentでインキュベーションした後、各ウェルはピンク色に変わり、発光レベルは標準的なCaspase-Glo™ Assayよりも幾分か下がりますが、パフォーマンスに大きな影響は与えません。

目的: 化合物の細胞毒性メカニズムの決定 (CytoTox-ONE® Assay [LDH放出、蛍光法]とCaspase-Glo™ 3/7 Assay [カスパーゼ-3/7、発光法])

1. 96ウェルプレート (黒または白) で細胞を培養 (培地100µl) し、薬剤で処理。
2. CytoTox-ONE™ Substrateを2X濃度に再溶解し、25µl/ウェル添加。
3. 振盪しながら室温で10分間インキュベーション。Technical Bulletin #TB306に従い蛍光を測定 (560Ex/590Em) し、ネクロシス細胞を測定。
4. 等量 (125µl) のCaspase-Glo™ Reagentを各ウェルに添加。
5. ルシフェラーゼが定常状態に達するまで室温で1時間インキュベーション。Technical Bulletin #TB323に従い発光を測定。

備考: マルチアッセイの場合、Caspase-Glo™ Reagentでインキュベーションした後、各ウェルはピンク色に変わり、発光レベルは標準的なCaspase-Glo™ Assayよりも幾分か下がりますが、パフォーマンスに大きな影響は与えません。

目的: 細胞毒性と細胞生存性の決定 (CytoTox-ONE® Assay [LDH放出、蛍光法]とCellTiter-Glo® Assay [細胞生存性、ATP])

1. 96ウェルプレート (黒または白) で細胞を培養 (培地75µl) し、薬剤で処理。
2. CytoTox-ONE™ Substrateを1X濃度に再溶解し、50µl/ウェル添加。
3. 振盪しながら室温で10分間インキュベーション。Technical Bulletin #TB306に従い蛍光を測定 (560Ex/590Em)。
4. CellTiter-Glo® Substrateを再溶解し、20mM DTTを添加。各ウェルに等量 (125µl) 添加。
5. 穏やかに振盪しながら室温で1時間インキュベーション。Technical Bulletin #TB288に従い発光を測定。

備考: マルチアッセイの場合、Caspase-Glo™ Reagentでインキュベーションした後、各ウェルはピンク色に変わり、発光レベルは標準的なCellTiter-Glo® Assayよりも幾分か下がりますが、パフォーマンスに大きな影響は与えません。

目的: 異なるカスパーゼ活性の測定 (Caspase-Glo™ 8または9 Assay [発光]とApo-ONE® Assay [カスパーゼ-3/7活性、蛍光法])

1. 96ウェルプレート (黒または白) で細胞を培養 (培地100µl) し、薬剤で処理。
2. Caspase-Glo™ 8または9 Assay Reagentを調製。Apo-ONE® Substrateを解凍し、Caspase-Glo™ 8または9 Assay Reagentで200倍に希釈 (50µl/10ml Caspase-Glo™ Reagent)。このアッセイ法ではApo-ONE® Bufferは未使用。各ウェルに等量 (100µl) 添加。
3. 室温で1時間インキュベーション。Technical Bulletin #TB332または#TB333に従い発光を測定し、カスパーゼ-8または-9活性を測定。
4. Technical Bulletin #TB295に従いApo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assayで蛍光 (485Ex/527Em) を測定し、カスパーゼ-3活性を測定。

要約

マルチアッセイは、複雑な細胞内プロセスを理解するためのセルベースアッセイを補正する効果的な方法です。プロメガが提供する広範なホモジニアスセルベースアッセイは、複雑な細胞内プロセスを詳細に調べる上で必要な柔軟性とツールを提供します。

参考文献

1. Riss, T. *et al.* (2003) *Cell Notes* **6**, 6–12.
2. Niles, A. *et al.* (2004) *Cell Notes* **9**, 11–14.
3. Riss, T. and Moravec, R. (2003) *Promega Notes* **83**, 10–13.
4. Riss, T. and Moravec, R. (2004) *Assay Drug Dev. Technol.* **2**, 51–62.

表3. プロメガのホモジニアス細胞生存性試験およびアポトーシスアッセイを組み合わせたマルチアッセイ（培地と細胞を分けたアッセイ）

目的：細胞毒性とカスパーゼ-3/7活性の決定（CytoTox-ONE® Assay [LDH放出、蛍光法]とApo-ONE® Assay [カスパーゼ-3/7、蛍光法]）

1. 96ウェルプレート（黒または白）で細胞を培養（培地100μl）し、薬剤で処理。
2. 上澄を別のプレートに移した後、CytoTox-ONE™ Reagentを添加し、ネクローシス細胞の指標であるLDH放出を測定。
3. Technical Bulletin #TB306に従い、インキュベーション後、蛍光を測定（560Ex/590Em）。
4. Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Reagentを細胞を含む元のプレートに添加し、1~4時間室温でインキュベーション。
5. Technical Bulletin #TB295に従い、Apo-ONE® Assayによる蛍光（485Ex/527Em）を測定。

目的：細胞毒性と細胞生存性の決定（CytoTox-ONE® Assay [LDH放出、蛍光法]とCellTiter-Glo® Assay [細胞生存性、発光法]）

1. 96ウェルプレート（黒または白）で細胞を培養（培地100μl）し、薬剤で処理。
2. 上澄を別のプレートに移した後、CytoTox-ONE™ Reagentを添加。
3. Technical Bulletin #TB306に従い、インキュベーション後、蛍光を測定（560Ex/590Em）。
4. CellTiter-Glo® Reagentを細胞を含む元のプレートに添加し、Technical Bulletin #TB288に従い、10分間室温でインキュベーション後、発光を測定。

表4. プロメガの細胞生存性試験およびレポーターアッセイを組み合わせたマルチアッセイ

目的：レポーター遺伝子からのシグナルを細胞生存性で補正（EnduRen™ Live Cell Substrate [ウミシイタケルシフェラーゼ、発光]とCellTiter-Glo® Assay [細胞生存性、発光法]）

1. 96ウェルプレート（黒または白）で細胞を培養（培地90μl）し、薬剤で処理。
2. Technical Manual #TM244に従いEnduRen™ Live Cell Substrateを希釈。EnduRen™ Substrate（60μM）を10μl/ウェル添加し、37℃、5% CO₂で2時間インキュベーション。EnduRen™ Substrateは、細胞の耐性によって、薬剤処理の前または後のいずれかに添加することができます。
3. レポーター活性を示す発光を測定。
4. 等量のCellTiter-Glo® Reagent（100μl/ウェル）を添加した後、細胞溶解を促進させるために旋回式のシェーカーで2分間混和し、発光シグナルを安定させるためにさらに10分間室温でインキュベーション。
5. Technical Bulletin #TB288に従い、細胞生存性を示す発光を測定。

目的：遺伝子制御とアポトーシスの関わりを決定（EnduRen™ Live Cell Substrate [ウミシイタケルシフェラーゼ、発光]とApo-ONE® Assay [カスパーゼ-3/7、蛍光]）

1. 96ウェルプレート（黒または白）で細胞を培養（培地90μl）し、薬剤で処理。
2. Technical Manual #TM244に従いEnduRen™ Live Cell Substrateを希釈。EnduRen™ Substrate（60μM）を10μl/ウェル添加し、37℃、5% CO₂で2時間インキュベーション。EnduRen™ Substrateは、細胞の耐性によって、薬剤処理の前または後のいずれかに添加することができます。
3. 発光を測定。
4. 等量のApo-ONE® Reagent（100μl/ウェル）を添加し、室温で1時間インキュベーション。
5. Technical Bulletin #TB295に従い、蛍光（485Ex/527Em）を測定。

プロトコル

- ◆ CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay
Technical Bulletin #TB288
www.promega.com/tbs/tb288/tb288.html
- ◆ CellTiter-Blue® Cell Viability Assay Technical Bulletin #TB317
www.promega.com/tbs/tb317/tb317.html
- ◆ CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay
Technical Bulletin #TB306
www.promega.com/tbs/tb306/tb306.html
- ◆ Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay Technical Bulletin #TB295
www.promega.com/tbs/tb295/tb295.html
- ◆ Caspase-Glo™ 3/7 Assay Technical Bulletin #TB323
www.promega.com/tbs/tb323/tb323.html
- ◆ Caspase-Glo™ 8 Assay Technical Bulletin #TB332
www.promega.com/tbs/tb332/tb332.html
- ◆ Caspase-Glo™ 9 Assay Technical Bulletin #TB333
www.promega.com/tbs/tb333/tb333.html
- ◆ EnduRen™ Live Cell Substrate Technical Manual #TM244
www.promega.com/tbs/tm244/tm244.html

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Caspase-Glo™ 8 Assay	100ml	G8202	290,000
Caspase-Glo™ 9 Assay	100ml	G8212	290,000
Caspase-Glo™ 3/7 Assay	100ml	G8092	290,000
Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay	100ml	G7791	250,000
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	10 × 10ml	G7571	50,000
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	20ml	G8080	16,000
CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay	1,000–4,000 assays	G7891	49,000
EnduRen™ Live Cell Substrate	3.4mg	E6482	130,000