

Cell based assay に求めるルミノメーターって

[Vol. 12]

高感度のセルベースアッセイに蛍光と発光が多用されてきました。

そもそも、蛍光と発光を比較すると、その原理から利用上大きな違いがあります。蛍光は励起光を強くすることにより、高い輝度が得られますがその代償として、サンプルの純度が低いと、混ざりものによる高いバックグラウンドの影響をうけます。一方発光は酵素あるいは化学反応を利用しており、蛍光に比較して輝度は低くなりますが、自然発光するものはゼロに等しく、低いバックグラウンドにより高いS/B比が得られます。したがって、サンプルに混ざりものが多いほど、発光はその威力を発揮します。

セルベースアッセイの場合、細胞溶解の有無にかかわらず、細胞成分あるいは細胞が測定サンプルに含まれるため、発光のメリットが生きてきます。洗浄しない Homogenous なアッセイ系では、評価化合物の自家蛍光も大きな問題となります。

さて、Promega の得意とするレポーターアッセイ。蛍光タンパク質、あるいはルシフェラーゼが多用されています。レポーターアッセイにも、タンパクの発現を観察するものと、細胞内挙動を観察するものがあります。蛍光はバックが高く、定性的な局在を見るために有効な方法で、イメージングに向いています。一方、発光はバックグラウンドが低く、高感度で定量性を求める実験に向いているといえます。

セルベースアッセイをする実験環境でプレートリーダーが普及しています。

蛍光、発光の各専用装置、あるいはどちらも可能なマルチプレートリーダーがあります。本来は、キュベットを用いた蛍光分光高度計あるいはチューブルミノメーターが起源であることから、ウェル内部に均一にサンプルが存在するものとして設計されており、顕微鏡のような焦点といった考え方は基本的にはありません。

蛍光測定の場合、プレートリーダーはウェル内部の一部のみに励起光を照射、従ってサンプルの一部のみを測定しています。また、レポータータンパクの発現が十分に高くないと、高いバックグラウンドに埋もれ、シグナルを取ることが難しくなります。実際、一般的な蛍光プレートリーダーで GFP の検出、定量ができたケースは決して多くありません。もちろん、焦点をもつ顕微鏡機能を備えた装置であれば別の話。一方、発光はバックが低い上に、ウェル内全体を測定しますので、より定量に向いています。

さて、発光を利用した多種多様のセルベースアッセイを最大限利用するために以下のようなパフォーマンスを持つ装置が望まれます(図1)。

① 高感度であること

セルベースアッセイの観点からすると、レポーターアッセイが感度を求める典型です。測定時におけるルシフェラーゼの発現が潤沢な場合は問題ないですが、

トランスフェクションの難しい細胞あるいは不均一細胞など、発現量の少ないルシフェラーゼの場合、感度は重要です。感度が不十分な場合、アッセイ法の見直しを迫られます。

ハードウェア的には、光を最大限検出装置に集めるために、検出器をサンプルに近づける。これは、蛍光とのマルチモードリーダーで蛍光・発光両光学系併用の場合、フィルターやミラーがあり、どうしても検出器がサンプルから遠くなります。(図2) また NanoBRET を提供する立場からすると、ルミノメーターでありながら、光学フィルターを挟む必要がありますが、フィルターによる距離のロスが最小限にされていることも重要です。

また、検出装置の前にアパチャー(マスク)を備えている場合、これがピンホールのように小さくなく、できるだけウェルのサイズに近いことも、最大限光を集め、高感度化に重要になります。

② ダイナミックレンジが広いこと

これは感度と相反する機能でもあります。想定よりも発光が大きかった場合、振り切れてしまいます。これを避けるために、アパチャーを絞る、あるいはゲインを下げる等々の対策が装置にあります。しかし、少なくとも再度測定あるいはサンプル調製する必要があります。これら変更でも対応できない場合は、やはりアッセイ系の見直しに迫られてしまいます。

ゲインの設定は、予備測定をして最適なセッティングをすればよいのですが、実験の再現性を含めた設定をしないと、そこで実際には振り切れてしまうということにもなりかねません。

③ クロストークの問題

1990年代前半、フラッシュタイプの発光しかなかった頃は問題ありませんでしたが、グロータイプの発光が可能になって、クロストークが問題になってきました。測定しているウェルの周りのウェルの発光シグナルを拾ってしまうというものです。プレート内の発光によりプレートの上空間がぼんやりと明るくなります。そこで、測定ウェルだけのシグナルを検出することにより、より正確な実験データを導き出すことが重要になります。

④ 使いやすさ

発光アッセイを簡便にするためにも、使いやすい簡単な装置であることも望まれます。

ソフトウェアが使いやすいこと。これはPCの発展が寄与しています。また、大量のサンプルをこなすために、十分な予備検討ができる場合は別として、セッティングが簡単であることも重要です。上述、アパチャーの選択、ゲインの設定は、装置のパフォーマンスを最大限利用するものですが、装置の最適化でもあるため、少量サンプルの場合は、変動要因は少ない方が簡単です。実際、蛍光と比較して励起、蛍光両波長選択をしなくてよいことも発光法のメリットです。

試薬のみならず、上述のようなパフォーマンスの高い装置をご利用いただけることが、発光を用いたアッセイで簡便に最大限の結果を得るために寄与すると考えています。

詳しくは、プロメガクラブページまで
www.promega.co.jp/promegaclub.html

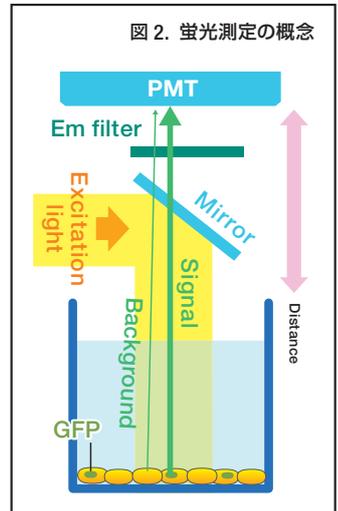


図2. 蛍光測定概念

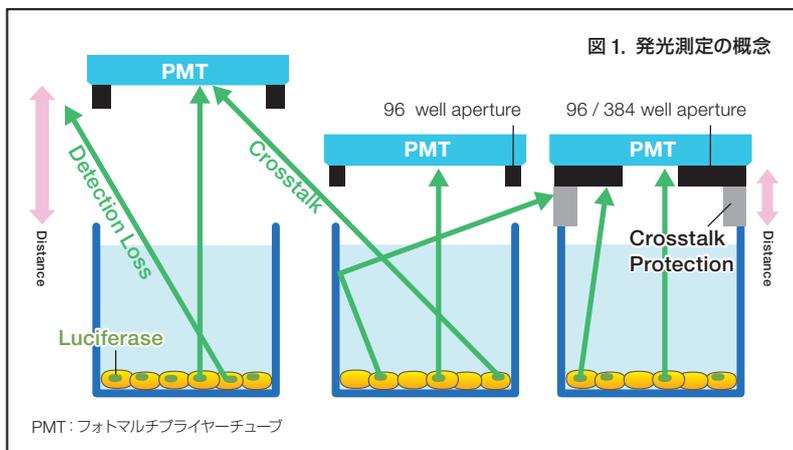


図1. 発光測定概念

プロメガ株式会社

本社 〒103-0011
 東京都中央区日本橋大伝馬町14-15 マツモトビル
 Tel. 03-3669-7981 / Fax. 03-3669-7982

テクニカルサービス

Tel. 03-3669-7980 / Fax. 03-3669-7982
 E-Mail : prometec@jp.promega.com