

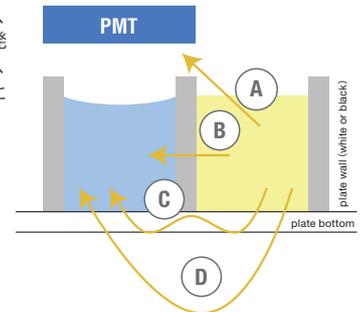
発光プレートリーダーでのプレートの 選択を考える [Vol. 14]

発光アッセイでマイクロプレートはどうすればよいか

マルチプレートリーダーで利用できるプレートの種類は多種多様で、最適なものを選ぶ半面、測定の観点から、望ましくないものを使ってしまふ恐れもあります。弊社で扱っているキットは主にルシフェラーゼを利用した長時間発光技術を用いています。本来ルシフェラーゼはフラッシュタイプのシグナルでしたが、長時間発光の基質の開発により、扱いが便利になった反面、隣のウエルの光の漏れこみ、いわゆるクロストークが起き、これをいかに押さえ込むかという点が問題になります。

今回は細胞を扱った実験で多く使われている底が透明なプレートについて考察をします。

クリアボトムプレートを用いた場合、4種のクロストークが考えられます。(右 模式図)



- A** ; プレートトップと PMT の距離 (装置の構造、あるいは蓋をしたままの測定など)
- B** ; プレートの材質、色、厚さなど
- C** ; クリアボトムプレートは多くの場合透明なポリスチレンの板であり、その中を走る光
- D** ; プレートボトムを通して拡散した光

今回以下の測定を行いました。

プレート・シール：すべて Corning 社

96 ウェルクリアボトムプレート

白プレート：cat # 3917 クリアボトム白プレート：cat # 3610
 黒プレート：cat # 3916 クリアボトム黒プレート：cat # 3603

384 ウェルクリアボトムプレート

クリアボトム白プレート：cat # 3707 クリアボトム黒プレート：cat # 3712

プレートシール

白プレートシール：cat # 38446 黒プレートシール：cat # 38496

サンプル調製

96 ウェルプレート

Bactiter™ Glo (Promega Cat. # G8231) の取り扱い説明書に従い、適当な濃度の ATP 溶液に Bactiter™ Glo を等量混和し 1 well あたり 200 μL 分注。周りのウェルには精製水を 200 μL 分注。

384 ウェルプレート

Luciferase Assay System (Promega cat# E1500) の取り扱い説明書に従い、適当な濃度の Beetle Luciferin (Promega cat# E1601) 溶液に Luciferase Assay System を 1 : 5 の割合で混和し 1 well あたり 25 μL 分注。

クリアボトムプレートは測定後、ボトムに白あるいは黒シールを貼り付けた後に測定。

測定装置 GloMax Discover (Promega) 0.3sec/well 設定

データ処理 Sample を囲むウェルのクロストークを下記式に従い、算出。

$$\text{Crosstalk (\%)} = \frac{(a+b+c+d+e+f+g+h)}{8} \times \frac{100}{A}$$

(blank 補正はしていません。)

a	d	f
b	A	g
c	e	h

結果

format	Plate color	bottom color	Corrected count (CPS) #	Recovery (%)	Crosstalk (%)
96	白	白	268,250,000	—	0.0070
		クリア	92,617,267	100	0.094
		クリア / 白シール	161,029,913	174	0.40
	黒	クリア / 黒シール	89,699,356	97	0.033
		黒	10,474,142	—	0.00044
		クリア	9,773,454	100	0.074
384	白	クリア / 白シール	12,775,906	131	0.0020
		クリア / 黒シール	10,163,200	104	0.00040
		白	266,456,321	—	0.34
黒	クリア	106,943,776	100	0.18	
	クリア / 白シール	156,059,016	146	1.2	
	クリア / 黒シール	97,276,787	91	0.13	
384	黒	黒	5,750,520	—	0.0010
		クリア	6,646,168	100	0.067
		クリア / 白シール	7,716,353	116	0.061
		クリア / 黒シール	6,350,681	96	0.0026

corrected count : 測定時間による発光の減衰等を補正した値。

考察

記載のプレートを用いて、200 μL、あるいは 40 μL 分注という条件で実施している。したがって、容量を変更する、あるいはプレートの型番、メーカー、さらには測定装置を変更することにより、結果は異なるものの、傾向は同様と考えられる。

384 well 黒 plate では白シールと黒シールで cross-talk (%) に 2 倍程度の違いとなっているが、カウントが低いため大きな差が認められなかったと考えられる。

結論

プレートを白から黒にすることにより、カウントは 1/10 ~ 1/20 に低下する。(ボトムがクリアか否かにかかわらず。)

96, 384 両フォーマットにおいて、クリアボトム白プレートに白シールを貼ると、カウントは 50 ~ 70% 増加するものの、クロストークは 5 倍程度増加した。一方、黒シールを貼ると、カウントは最大 10% 程度減少するが、クロストークは 1/3 程度低減する。

96, 384 両フォーマットにおいて、クリアボトム黒プレートに白シールを貼ると、カウントは増加し、クロストークは最大 40 倍程度減少する。一方、黒シールを貼ると、カウントは 10 ~ 20% 程度減少するが、クロストークは 1/20 ~ 1/200 に低減した。

	白シール		黒シール	
	カウント	クロストーク	カウント	クロストーク
クリアボトム白プレート	↑	↑	↓	↓
クリアボトム黒プレート	↑	↓	↓	↓

発光試験において顕微鏡観察のためクリアボトムのプレートを用いる際は、補正 (カウント、クロストーク) する目的と、用いるクリアプレートの色に応じて、シールの選択が考えられる。クロストーク補正を優先する場合は、黒シールが第一選択と考えられる。

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