

Technical Review

パーキンエルマー社ARVO™MXを用いた MultiReporter Assay System -Tripluc®- の解析例

東洋紡績(株) 敦賀バイオ研究所 浅井 友美

はじめに

MultiReporter Assay System -Tripluc®-は、3色のルシフェラーゼをレポーターとして用いる、遺伝子発現解析システムです。これら3種のルシフェラーゼ (SLG (緑)、SLO (橙)、SLR (赤)) が、いずれもD-luciferinを基質とすることから、1ステップのアッセイで3つのレポーター活性の評価が可能な画期的なシステムです。

これらのルシフェラーゼの活性測定は、細胞を溶解剤で溶解し、発光基質と混ぜて測定する*in vitro*計測 (破壊系計測) や、培養液にD-luciferinを溶解し、細胞内に浸透するD-luciferinによって、細胞を生かしたまま計測する*in vivo*計測 (非破壊系計測) によって行うことが可能です。

弊社では今まで、「MultiReporter Assay System -Tripluc®- Detection Reagents」(細胞溶解剤、基質溶液を含む) を用いる*in vitro*計測実験の測定にシングルチューブタイプのルミノメーター「カラフルックアナライザー™」をお奨めしてきました。しかし、最近の検討により、市販のマルチウェル型のルミノメーターを用いることが可能であることが分かりました。

本稿では、「MultiReporter Assay System -Tripluc®- Detection Reagents」とパーキンエルマー社ARVO™MXを用いたMultiReporter Assay System -Tripluc®-のプレートリーダーによる解析例をご紹介します。

方法

プレートリーダーを用いた*in vitro*計測のフローを図1に示します。ルシフェラーゼ遺伝子を含むプラスミドを導入し、種々のアッセイが行われた細胞のプレートから培地を除去後、溶解剤 Lysis Solutionを加え、細胞を溶解します。続いて、基質溶液 Assay Reagentを加え、プレートリーダーで測定します。

今回、プレートリーダーとして、インジェクター付のパーキンエルマー社ARVO™MX (図2) を用い、Assay Reagentの分注は同機に装備されたインジェクターを使用しました。また、3枚の光学フィルターとして、ARVO™MXには、①510±30 nmフ

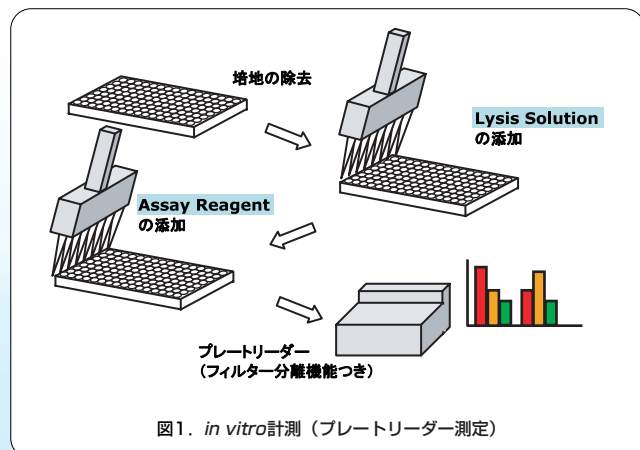


図1. *in vitro*計測 (プレートリーダー測定)



図2. パーキンエルマー社ARVO™MX 510±30nmフィルター、595±30nmフィルター、660±50nmフィルターの3枚の光学フィルターを装着。

ィルター、②595±30 nmフィルター、③660±50 nmフィルターを装着しました。

測定は、あらかじめ各ルシフェラーゼの発光について、全光 (フィルター無挿入) に対する各フィルター透過光の割合を決定しました (T_{ij} : $i=1,2,3$ (フィルター①、②、③)、 $j=g,o,r$ (ルシフェラーゼSLG、SLO、SLR))。つづいて、各サンプルプレートについて、3枚のフィルター (F_1 、 F_2 、 F_3) を用いて測定を行い、測定値からMicrosoft® Excelを用いて下式を計算し、各ルシフェラーゼの発光量 (G 、 O 、 R) を算出しました (特許出願中)。

$$\begin{pmatrix} G \\ O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} T_{1g} & T_{1o} & T_{1r} \\ T_{2g} & T_{2o} & T_{2r} \\ T_{3g} & T_{3o} & T_{3r} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F_1 \\ F_2 \\ F_3 \end{pmatrix}$$

1. 定量性の検討

白色不透明タイプの96ウェルプレートのcolumn A~Hのそれぞれに、各ルシフェラーゼを発現した細胞ライセートを表1の要領で混合し、試料を調製しました。続いて、インジェクターを用いて、各ウェルに「Detection Reagents」 Assay Reagentを125µlずつ加え、3枚のフィルターの透過光を測定し、各ルシフェラーゼの活性を算出しました。

表1. 試料の調製

Row No.	1,2	3,4	5,6	7,8	9,10	11,12
SLG lysate (µl)	1	1	1	1	1	1
SLO lysate (µl)	24	19.2	14.4	9.6	4.8	0
SLR lysate (µl)	0	4.8	9.6	14.4	19.2	24

2. 解析例 (AP1及びNFκBレスポンスエレメントの活性化の検討)

評価用コンストラクトとして、pSLO-test、pSLR-testの各ルシフェラーゼの上流にSV40プロモーターのコア領域を挿入し、そのさらに上流にAP1レスポンスエレメント (pSLO-testのみ)、及びNFκBレスポンスエレメント (pSLR-testのみ) を挿入したプラスミド (pSLO-AP1、pSLR-NFκB) を調製しました。

アッセイは、白色不透明タイプの96ウェルプレートにHeLa S3細胞を4×10⁴cells/wellずつ播種し、翌日、1ウェルあたりpSLG-HSVtk SLG 0.03µg、pSLO-AP1 0.13µg、pSLR-NFκB 0.04µgを混合し、トランスフェクション試薬Lipofectamine™2000 (インビトロジェン社) を用い

て無血清培地下でトランスフェクションを実施しました。24時間後に、0~10ng/ml TNF α 、0~100nM PMAを含む培地に置換し、4時間インキュベートしました(図4)。

インキュベート終了後、培地を除去し、「Detection Reagents」Lysis Solutionを25 μ l/well加え、軽く振とうしながら20分間室温でインキュベートしました。続いて、インジェクターを用いて、各ウェルに「Detection Reagents」Assay Reagentを125 μ lずつ加え、3枚のフィルターの透過光を測定し、各ルシフェラーゼの活性を算出しました。

結果及び考察

1. 定量性の検討(図3)

3枚のフィルターの測定値より算出されたSLG、SLO、SLRの相対光量を図3にプロットしています。各ウェルに一定量を添加しているSLGについてはほぼ一定の値を、20%ずつ添加量を変えたSLOやSLRについてはその増減に応じた値が得られ、測定・算出の方法が適正であることが分かりました。

また、それらの値がプレート全体96サンプルにわたって安定していることから、96ウェルプレートを用いるハイスルーブットアッセイが可能であることが示唆されました。

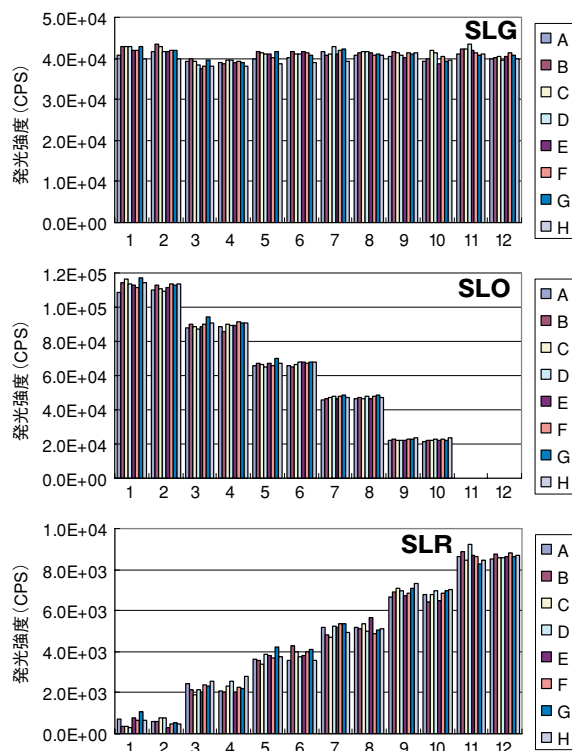


図3. 96ウェルプレートを用いた発光強度測定結果
A~H及び1~12は96ウェルプレートの行と列を示しています。

関連商品

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
プロモーター挿入用ベクター pSLO-test	20 μ g	-20 $^{\circ}$ C	MRV-102	¥80,000
プロモーター挿入用ベクター pSLR-test	20 μ g	-20 $^{\circ}$ C	MRV-103	¥80,000
HSVtkコントロールベクター pSLG-HSVtk control	20 μ g	-20 $^{\circ}$ C	MRV-301	¥80,000
MultiReporter Assay System -Tripluc [®] , <i>in vitro</i> アッセイ用試薬 Detection Reagents (Lysis Solution, Assay Reagent)	100回用	-80 $^{\circ}$ C	MRA-101	¥30,000
	500回用		MRA-102	¥99,000
	10,000回用		MRA-103	¥1,350,000

※特許の関係上、ご購入の際には購入申込書への記入が必要です。企業の方のご購入に関しては、ライセンス契約が必要です。詳しくは弊社までお問い合わせください。

※ベクターに関しては別途セット販売をしております。詳しくは、弊社までお問い合わせください。

2. 解析例(図4、5)

SLO、SLRルシフェラーゼ遺伝子にAP1レスポンスエレメント、NF κ Bレスポンスエレメントを連結し、TNF α 、PMAに対する応答性を検証しました。

測定値よりSLG、SLO、SLRの相対光量を算出しました。次に、内部標準としてトランスフェクションしたHSVtkプロモーター下のSLGに対する相対活性としてSLO及びSLR値を図5にプロットしました。この結果、それぞれTNF α やPMAに対し、濃度依存性的なルシフェラーゼの発現活性を確認することができました。

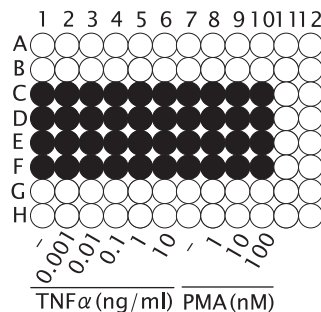


図4. 解析例で用いたアッセイ条件
●のウェルにpSLG-HSVtk control, pSLO-AP1, pSLR-NF κ Bを同量トランスフェクションし、上記条件でインキュベートしました。

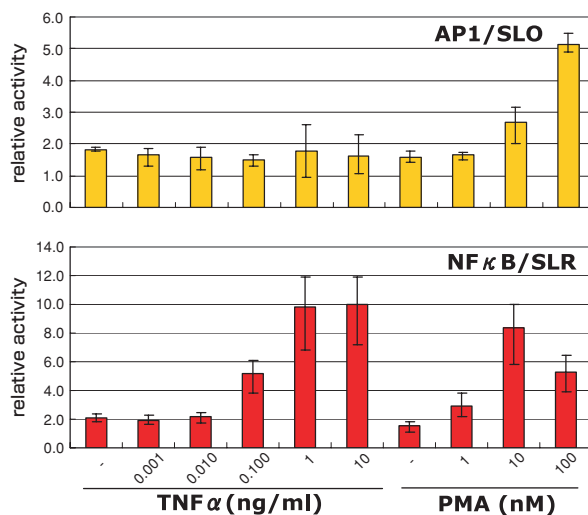


図5. AP1及びNF κ Bレスポンスエレメント活性化実験測定結果

本稿では、「MultiReporter Assay System -Tripluc[®]」をプレートリーダーを用いて測定が可能であることをご紹介いたしました。

詳細なパラメーターや実験条件にご関心のある方は是非弊社テクニカルラインまでお問い合わせください。