

Molecular Devices社のSpectraMax Lプレートリーダーで求めた Ready-To-Glow™ Secreted *Metridia* Luciferase レポーターシステムの検出限界と直線範囲

クロンテック（株）細胞生物学グループ

Ready-To-Glow Secreted *Metridia* Luciferase レポーターシステムは細胞溶解が不要な1ステップの生細胞アッセイの利点と高感度という酵素システムの利点を併せもっており、均一系で簡単にアッセイを行うことができます。本研究では、本システムのダイナミックレンジと検出限界を詳細に調べました。また、Molecular Devices社のSpectraMax L マイクロプレートリーダーと384ウェルプレートを用いることにより、ハイスループットな検出を簡便に行えることを実証しました。

Ready-To-Glow *Metridia* Secreted Luciferaseの利点

クロンテックのReady-To-Glow Secreted Luciferase Reporter Systemは、生細胞アッセイの利点と高感度という酵素アッセイの利点を併せもっています。本システムは、カイアシ類の海洋微生物 *Metridia longa* 由来の分泌型ルシフェラーゼ（N末端に分泌シグナルペプチドを含む24 kDaのタンパク質；1）をベースにしています。この分泌型ルシフェラーゼ遺伝子では、スプライス部位が除去され、mRNAの半減期を伸ばすために配列が最適化され、さらにヒトでの使用頻度の高いコドンに変換されています。分泌型ルシフェラーゼは、シグナル伝達経路の研究におけるプロモーター活性の検出に理想的です（2-3）。*Renilla*（ウミシイタケ）やホタルのルシフェラーゼなどの非分泌型ルシフェラーゼレポーターと比べ、高い誘導性を示し、シグナルの安定性や強度が高いという利点があります（2）。細胞の培養上清のみがアッセイに用いられるため、細胞溶解を必要とせず、サンプリングにより細胞が悪影響を受けることはありません。1つの培養液から繰り返しサンプリングすることにより、タイムコース実験を行うことができます。これとは対照的に、他のルシフェラーゼは非分泌型のレポーターであるため、アッセイのために細胞を溶解する必要があり、サンプリングを繰り返し行うことはできません（図1）。

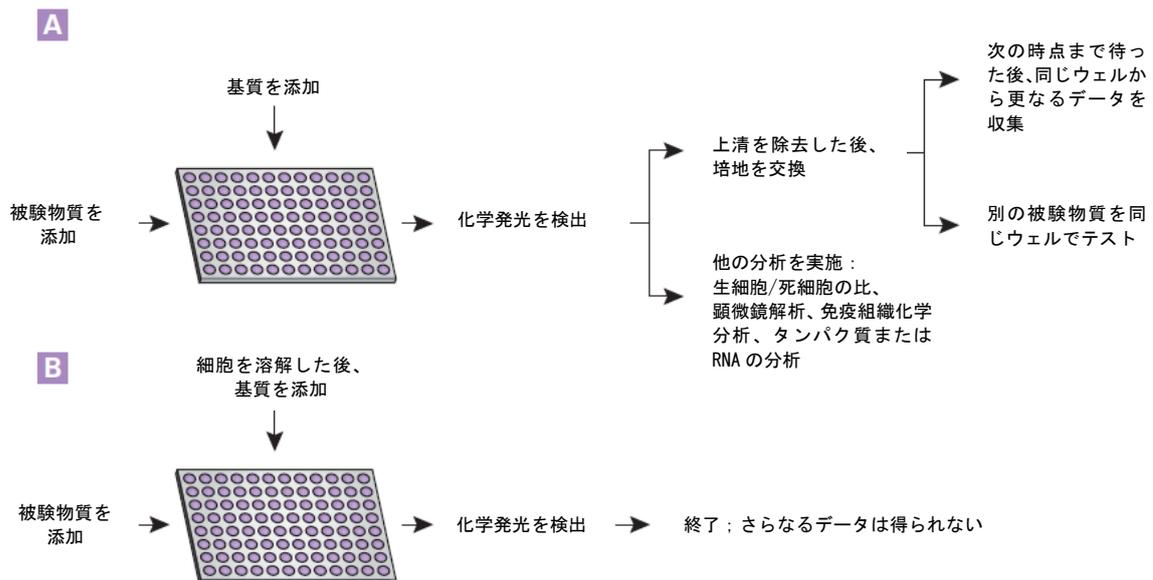


図1. Ready-To-Glow Secreted Luciferase Reporter Systemの簡便性と用途の広さ

パネルA. Ready-To-Glowは細胞を残しておくことができ、それを他の分析に利用することができる。そのため、1つのウェルから多くの結果を得ることができる。パネルB. 非分泌型のルシフェラーゼシステムでは細胞溶解が必要なため、細胞を他の分析に利用することができない。そのため、1つのウェルから1つの結果しか得られない。

Molecular Devices社のSpectraMax Lマイクロプレートリーダーの特長

分泌型 *Metridia* ルシフェラーゼの詳細な特性を調べるために、SpectraMax L マイクロプレート・ルミノメーター (4) を用いました。SpectraMax Lは超高速光子計数技術を用いているため、閃光および発光の測定に適しています。ノイズが低いため、シグナル/ノイズ比が非常に高く、クロストークが非常に低いです。8オーダー以上のダイナミックレンジをもっており、96ウェルおよび384ウェルプレートでの測定が可能です。データの収集と解析はSoftMax Proソフトウェアを用いて行いました。SoftMax ProソフトウェアはMolecular Devices社のすべてのマイクロプレートリーダーに装備されており、データの収集、解析および管理を行うことができ、またクロスプレート解析やカスタム計算を行うことができます (5)。クロンテックのReady-To-Glowを用いるプロトコールは、このソフトウェアのプルダウンメニューから直接利用することができます。

組換え*Metridia* ルシフェラーゼの高感度検出

レポーターを低濃度で検出するために、すべてのレポーターシステムは高感度を要求されます。検出限界を求めるために、組換え*Metridia* ルシフェラーゼを6×HNタグ融合タンパクとして大腸菌で発現させ、TALON技術を用いて精製しました。精製した*Metridia* ルシフェラーゼを、10%ウシ胎児血清 (FBS) 含有DMEM を含む96ウェルプレートのウェルに $1\sim 10^6$ fg/wellの濃度でスパイクしました。SpectraMax Lプレートリーダーを用いて、*Metridia* ルシフェラーゼ活性をアッセイプロトコールに従って測定しました。その活性は非常に広い濃度範囲 (少なくとも6オーダー) にわたって直線性を示し、96ウェルプレートでの組換え*Metridia* ルシフェラーゼの検出限界は非常に小さい値 (約2 fg/ウェル ; 40 fg/ml) でした (図2)。

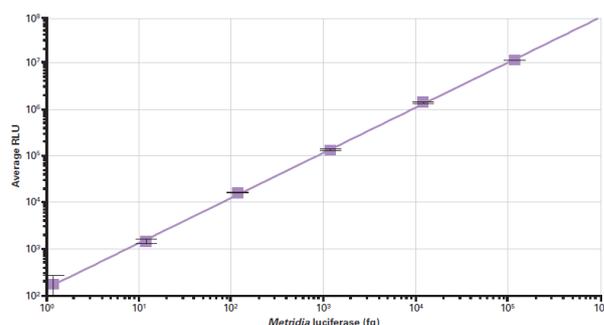


図2. 組換え*Metridia* ルシフェラーゼの検出限界
図に示した量 (fg/well) の組換え*Metridia*ルシフェラーゼを10% FBS含有DMEMにスパイクした。SpectraMax Lを用いて、*Metridia* ルシフェラーゼの活性を96ウェルプレートで測定した。検出限界は2 fg/well (40 fg/ml) であった。

培養上清中に分泌された組換え*Metridia* ルシフェラーゼ・シグナルの直線的なダイナミックレンジ

広範囲な濃度にわたる比較可能な定量データを得るために、どのようなレポーターアッセイでも広いダイナミックレンジが要求されます。*Metridia* ルシフェラーゼをコードするベクター (pMetLuc-Control) をHEK 293 細胞とCHO細胞に一過性にトランスフェクトし、それらの培養液を用いて分泌型 *Metridia* ルシフェラーゼ・シグナルのダイナミックレンジを求めました。トランスフェクションの24時間後に培養上清を採取し、10%FBS含有DMEMを用いて10倍希釈系列を作製しました。希釈サンプル中の培養上清の濃度は0.1%~100% (96ウェルプレートの場合) または0.0001%~100% (384ウェルプレートの場合) でした。SpectraMax Lプレートリーダーを用いて、*Metridia* ルシフェラーゼ活性をアッセイプロトコールに従って測定しました。希釈した培養上清を用いた場合、得られたシグナルは少なくとも4オーダーの範囲 (0.01%~100%) にわたって直線性を示し、どちらの細胞株でも、またどちらのプレートでも高いパフォーマンスが得られました (図3)。

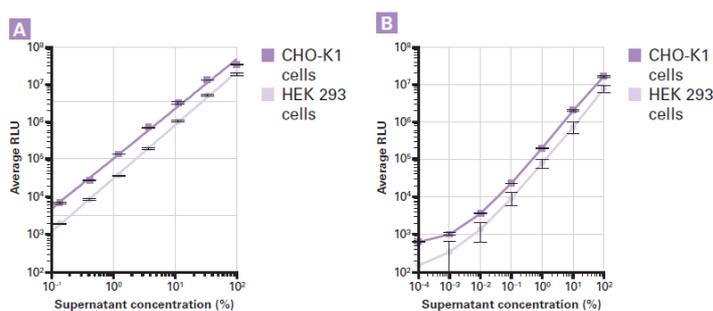


図3. 培養上清中に分泌された*Metridia* ルシフェラーゼの検出の直線範囲
HEK 293細胞とCHO細胞をpMetLuc-Controlベクターで一過性にトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞から培地サンプルを採取し、10%FBS含有DMEMで10倍希釈系列を図に示す濃度まで作製した。96ウェル (パネルA) または384ウェル (パネルB) プレートで、Ready-To-Glow *Metridia* ルシフェラーゼ活性をプロトコールに従って測定した。

均一なアッセイシステム

Ready-To-Glow Secreted *Metridia* Luciferase Reporter Systemは新たな研究機会を生み出すことができる技術です。このアッセイ法は感度が高く、ダイナミックレンジが広いため、通常、サンプルを希釈する必要がありません。また、細胞を溶解する必要がないため、他の細胞レポーターアッセイを同時に行うことができます。96ウェルプレートでも、またハイスループット測定に適した384ウェルプレートでも実験を行うことができます。Molecular Devices社のSpectraMax Lプレートリーダーは、高感度で検出限界が非常に小さいため、Ready-To-Glow Secreted *Metridia* Luciferase Reporter Systemで用いる発光測定装置として理想的です。

謝辞

技術的な助言を頂いたMolecular Devices社（現在はMDS Analytical Technologies社の一部門）のCathy Olsen氏に感謝いたします。

参考文献

1. Markova, S. V., *et al.* (2004) *J. Biol. Chem.* **279**(5):3212–3217.
2. Ready-To-Glow™ Secreted Luciferase System. (Summer 2006) *Clontechniques* **XXI**(2):12–13.
3. Ready-To-Glow™ Dual Secreted Reporter System. (October 2006) *Clontechniques* **XXI**(3):1.
4. SpectraMax L microplate reader: A flexible, sensitive luminometer for 96- or 384-well microplates. Molecular Devices Data Sheet (2006).
5. SoftMax Pro software: the industry standard in microplate data analysis. Molecular Devices Data Sheet (2006).

製品ガイド

- ▶ 分泌型レポーター（*Metridia* ルシフェラーゼ）による生細胞アッセイ