

アプリケーションノート

FlexStation 3 マイクロプレートリーダーを用いた デュアルルシフェラーゼ発現検出

Hoang Ha | Applications Scientist | Molecular Devices

はじめに

レポーター遺伝子アッセイは、細胞経路の活性化に伴う遺伝子発現の研究に重要なツールです。レポーター遺伝子と対象とする遺伝子配列（通常はプロモーターまたはその他の転写制御因子）を含むプラスミドを細胞にトランスフェクトします。プロモーターが活性化されると、レポーター遺伝子が発現し、その発現レベルを測定することができます。

ホタルルシフェラーゼは、広く使用されているレポーター遺伝子です。その発光シグナルを利用することにより、蛍光や他の手法よりも優れた感度が得られます。2つ目の発光レポーターであるウミシイタケルシフェラーゼは、トランスフェクション効率や細胞数などのばらつきを標準化する目的で構成的プロモーターの制御下でよく使用されます。ホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼの基質は異なるため、デュアルルシフェラーゼ検出アッセイを用いることにより両方の発光シグナルを同一のウェルで測定できます。

利点

- 1列単位での分注と同時検出による高いアッセイスループット
- 1ウェルあたりわずか10個の細胞数でホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼの発現を検出
- プリセットされているプロトコルにより効率的なアッセイ設定と速やかな結果の取得が可能

SpectraMax® DuoLuc Reporter Assay Kit を用いることにより、マイクロプレートのフォーマットで、ホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼ両方の発光シグナルの高感度な定量が可能となります。試料ウェルにホタルルシフェラーゼ標準溶液（以下、ホタル標準溶液）を添加するとホタルルシフェラーゼの発光反応が開始し、次にウミシイタケルシフェラーゼ標準溶液（以下、ウミシイタケ標準溶液）を添加するとホタルルシフェラーゼの発光が抑制され、同時にウミシイタケルシフェラーゼの反応が開始します。

FlexStation® 3 マルチモードマイクロプレートリーダーは、96および384ウェルのフォーマットの SpectraMax DuoLuc アッセイを、高感度およびハイスループットで行うことができます。FlexStation 3 リーダーでは、同時かつオンボードでの試薬ピペティング・発光検出により、一連の反応をリアルタイムでモニタリングすることができます（図1）。

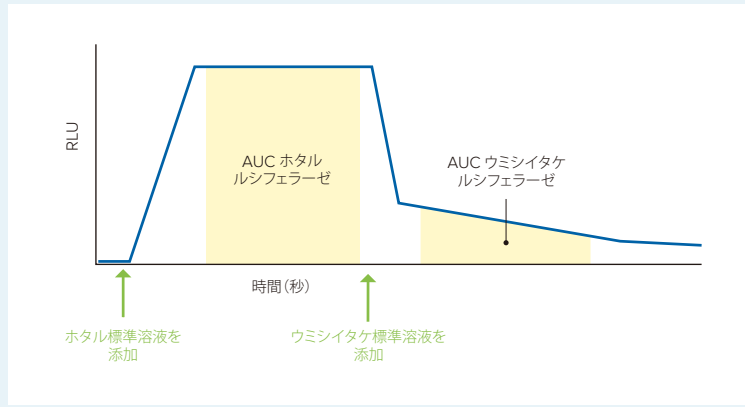


図1 FlexStation 3リーダーを用いた試薬添加からの反応のリアルタイムモニタリング。各反応フェーズ（ホタルルシフェラーゼおよびウミシイタケルシフェラーゼ）に相当する曲線下面積（AUC）をソフトウェアで算出する。

材料

- FlexStation 3 マルチモードマイクロプレートリーダー (Molecular Devices cat. #Flex3)
- FlexStation 3 8 チャンネルピペッターヘッド (Molecular Devices cat. #0200-6182)
- FlexStation 3 16 チャンネルピペッターヘッド (Molecular Devices cat. #0200-6183)
- 96 ウェル Black FlexStation ピペットチップ (Molecular Devices cat. #0900-0911)
- 384 ウェル Black FlexStation ピペットチップ (Molecular Devices cat. #9000-0764)
- SpectraMax DuoLuc Reporter Assay Kit (Molecular Devices cat. #R8361)
- HeLa 細胞 (ATCC cat. #CCL-2)
- pGL4.13[*luc2/SV40*] ホタルルシフェラーゼ発現ベクター (Promega cat. #E668A)
- pGL4.75[*hRluc/CMV*] ウミシイタケルシフェラーゼ発現ベクター (Promega cat. #E693A)
- ViaFect™ トランスフェクション試薬 (Promega cat. #E4981)
- Opti-MEM Reduced Serum Medium (ThermoFisher Scientific cat. #31985062)

方法

細胞のトランスフェクション

トランスフェクションに先立ち、組織培養用に処理した 6 ウェルプレートに、1ウェルあたり 2×10^5 個の HeLa 細胞を播種し、37 °C、5% CO₂ にて 24 時間培養しました。Opti-MEM 培地を用い、ホタルルシフェラーゼ発現ベクター pGL4.13[*luc2/SV40*] を 1 μg/μL、ウミシイタケルシフェラーゼ発現ベクター pGL4.75[*hRluc/CMV*] を 100 ng/μL となるように希釈しました。3 本のチューブに次の組成の混合物を準備し、穏やかに攪拌しました：Opti-MEM 培地 400 μL、ホタルルシフェラーゼ発現ベクター pGL4.13[*luc2/SV40*] 2 μL (2 μg)、ウミシイタケルシフェラーゼ発現ベクター pGL4.75[*hRluc/CMV*] 2 μL (200 ng)。それぞれのチューブに ViaFect 試薬 6 μL を添加し、穏やかに混合しました。チューブを室温で 10 分間インキュベートし、トランスフェクション複合体を形成させました。トランスフェクション複合体 200 μL を 6 ウェルプレートの各ウェルに滴下し、穏やかに攪拌して混合しました。細胞をインキュベーターに戻して 48 時間培養し、処理後にアッセイに用いました。

パラメーター	96 ウェル	384 ウェル
測定モード	発光	
測定の種類	Flex	
波長	全波長	
積算時間	200 ms	
総測定時間	2 分	3 分 40 秒
測定間隔	3.4 秒	5.2 秒
1 番目の化合物の添加	ホタル溶液 100 μ L を添加 高さ = 50 μ L 添加速度 = 4 添加時間 = 20 秒	ホタル溶液 25 μ L を添加 高さ = 25 μ L 添加速度 = 4 添加時間 = 20 秒
2 番目の化合物の添加	ウミシイタケ溶液 100 μ L を添加 高さ = 150 μ L 添加速度 = 4 添加時間 = 60 秒	ウミシイタケ溶液 100 μ L を添加 高さ = 75 μ L 添加速度 = 4 添加時間 = 70 秒
攪拌	1 番目の化合物の添加後 高さ = 50 μ L サイクル = 2 容量 = 50 μ L 2 番目の化合物の添加後 高さ = 100 μ L	1 番目の化合物の添加後 高さ = 25 μ L サイクル = 2 容量 = 25 μ L 2 番目の化合物の添加後 高さ = 25 μ L
データ計算	ホタル：20 ~ 67 秒 ウミシイタケ：68 ~ 120 秒	ホタル：20 ~ 80 秒 ウミシイタケ：80 ~ 220 秒

表 1 FlexStation 3 マイクロプレートリーダーの化合物添加およびアッセイパラメーター。

細胞溶解液の調製

6 ウェルプレートの各ウェルのトランスフェクション済み細胞をトリプシン処理し、10 等分量に分け、1500 rpm で 5 分間遠心処理して得られたペレットを PBS で 1 回洗浄しました。PBS を取り除き、細胞ペレットをアッセイ時まで -80 °C で保存しました。

アッセイの準備として、Passive Lysis Buffer および細胞ペレットを室温に戻し、各細胞ペレットを 150 μ L の Passive Lysis Buffer で溶解しました。室温に 15 分間置いて細胞を溶解しました。次に、1 ウェルあたりの細胞数が 4 ~ 8700 個の範囲の標準曲線を得るため、Passive Lysis Buffer を用いて細胞溶解液を 2 倍段階希釈しました。各濃度の細胞溶解液を、96 ウェルプレートの 3 ウェルにそれぞれ 20 μ L ずつ添加し、384 ウェルプレートの 4 ウェルにそれぞれ 10 μ L ずつ添加しました。

ルシフェラーゼアッセイの手順

キットのすべての構成成分を室温で解凍しました。Firefly Substrate (凍結乾燥品) 1 バイアル 2.2 mg に水 220 μ L を加えました。Aquaphile™ セレンテラジンを (凍結乾燥品) 1 バイアル 440 μ g に水 220 μ L を加えました。

ホタル標準溶液は、ホタルルシフェラーゼ基質を Firefly Assay Buffer で 50 倍に希釈して調製しました。ウミシイタケ標準溶液は、Aquaphile セレンテラジンを *Renilla* Assay Buffer で 50 倍に希釈して調製しました。96 ウェルプレート 1 枚に対して、対応する基質を 220 μ L 加えて 11 mL の標準溶液を調製しました。

表 1 に示したパラメータと、SoftMax® Pro ソフトウェアにプリセットされたプロトコルを使用しました。ソフトウェアのグラフィカルなインターフェースにより、化合物添加を簡単に設定することができました (図 2)。FlexStation 3 マイクロプレートリーダーは、1 列ごとに試薬を分注することができ、測定の種類として Flex を用いることで、これらのウェルを設定した時間において繰り返し測定することが可能です。各試料のリアルタイムカイネティックレースが作成されます。各カイネティックレース内において、ホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼのシグナルは区別でき、曲線下面積を算出できます (図 3)。

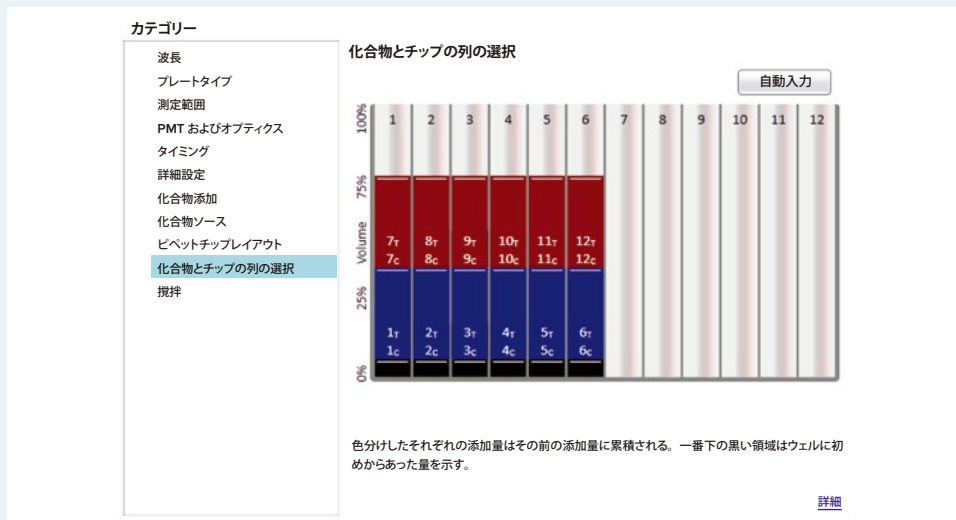


図2 FlexStation 3 マイクロプレートリーダー用 SoftMax Pro 7ソフトウェアのユーザーインターフェース。ソフトウェアのインターフェースは分かりやすく、チップと化合物の列の選択が簡単に行えるようになっている。

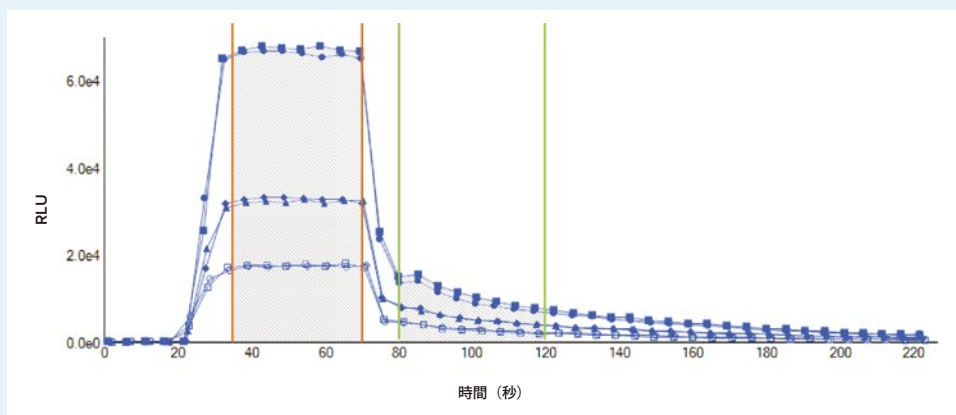


図3 DuoLuc カイネティックトレース。DuoLuc レポーターアッセイの発光シグナルを経時的に記録し、カイネティックトレースを作成した。384 ウェルプレートで3種類の濃度の細胞をアッセイした結果を示した。カイネティックトレースにおける、ホタルルシフェラーゼの曲線下面積 (35 ~ 70 秒)、およびウミシイタケルシフェラーゼの曲線下面積 (80 ~ 120 秒) を表示した。20 秒と 70 秒の時点で試薬を添加した。

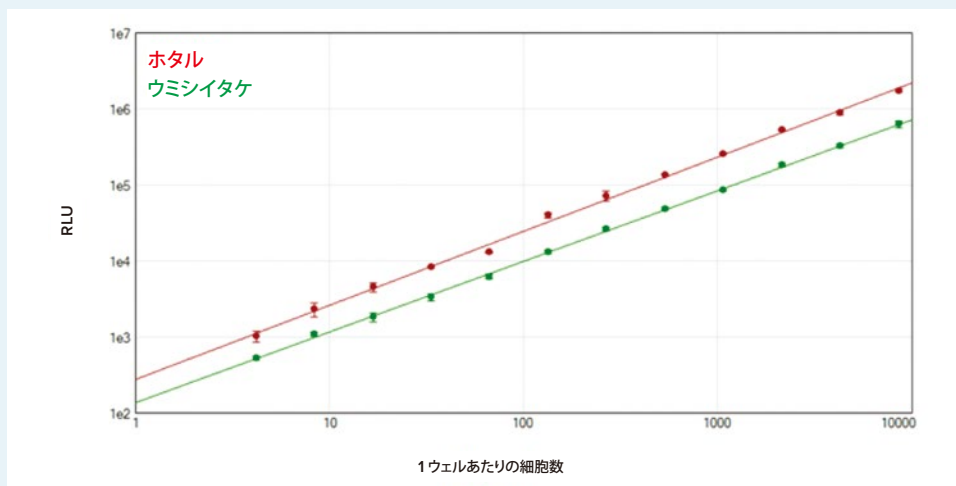


図4 96 ウェルのフォーマットで行った DuoLuc レポーターアッセイ。FlexStation 3 マイクロプレートリーダーを用いて 96 ウェルプレート上で DuoLuc レポーターアッセイを行った。SoftMax Pro ソフトウェアの log-log カーブフィットを用い、ホタルルシフェラーゼ (赤)、およびウミシイタケルシフェラーゼ (緑) の標準曲線をプロットした (それぞれ $r^2 > 0.998$)。各濃度について 3 回ずつ測定を行った。

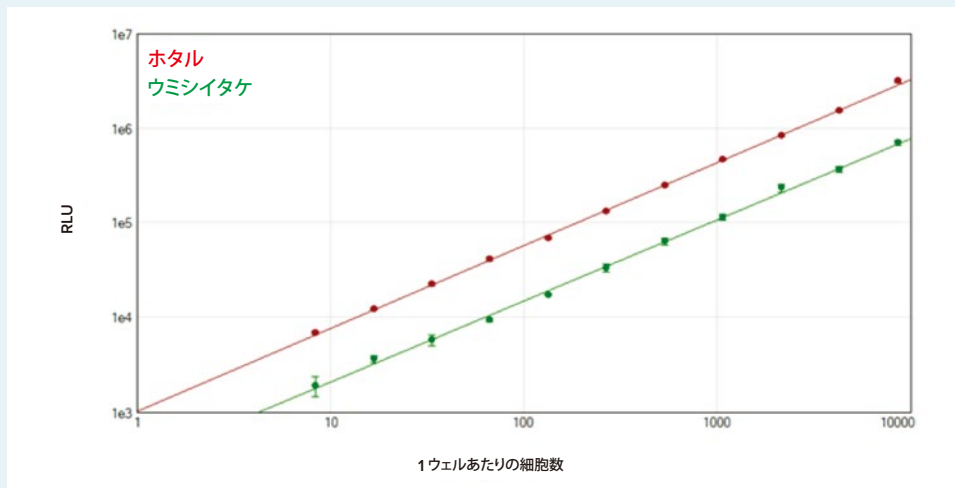


図5 384 ウェルのフォーマットで行った DuoLuc レポーターアッセイ。384 ウェルプレート上で SpectraMax DuoLuc レポーターアッセイを行った。SoftMax Pro ソフトウェアの log-log カーブフィットを用い、ホタルルシフェラーゼ (赤)、およびウミシイタケルシフェラーゼ (緑) の標準曲線をプロットした (それぞれ $r^2 > 0.998$)。各濃度について 4 回ずつ測定を行った。

結果

トランスフェクションした HeLa 細胞のホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼを、SpectraMax DuoLuc レポーターアッセイと FlexStation 3 マイクロプレートリーダーを用いて測定しました。96 ウェルプレートで行ったアッセイでは、優れた直線性と感度が認められました。1 ウェルあたりの細胞数が 8700 から約 4 個までの範囲で、ホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼの両方の発光を検出できました (図 4)。

384 ウェルプレートでのアッセイ性能は同等であり、同程度の直線性と、1 ウェルあたりの細胞数が最低約 8 個での検出が認められました (図 5)。

結論

液体工学と発光検出技術を搭載した FlexStation 3 マイクロプレートリーダーを用いることで、SpectraMax DuoLuc レポーターアッセイは、哺乳類細胞の遺伝子発現を正確に測定できる高感度なフラッシュ型発光アッセイとなります。このリーダーは、試薬を 1 列ごとに分注でき、また、設定した総測定時間をおとして 1 列単位でウェルを繰り返し測定できるため、デュアルインジェクターを用いたシステムよりも高いアッセイスループットが達成されます。SoftMax Pro ソフトウェアの直感的なインターフェースとプリセットされたプロトコルにより、デュアルルシフェラーゼアッセイの設定、実施、解析が速やかに行えます。

Contact Us

モレキュラーデバイスジャパン株式会社

Phone: [0120-993-656](tel:0120-993-656)

Web: www.moleculardevices.co.jp

Email: info.japan@moldev.com