

## 細胞ベースアッセイ用蛍光下方測定

Infinite® 200 PRO 緑色蛍光蛋白(GFP)の検出改善

### はじめに

細胞ベースの応用はライフサイエンス研究の中心である。その範囲は細胞毒性、増殖、アポトーシス、および GPCR シグナルアッセイから、ハイスループットスクリーニング (HTS) による創薬の応用に及ぶと考えられる。

可能な限り細胞単層を検出器に近付け、上部を覆っている増殖培地による非特異的な蛍光ノイズを回避するため、一般的に、接着細胞型をウェルの底部から分析する。したがって、細胞は必ずしも増殖培地表面上に均一に分布していないため、ウェルの底部全体の照明および測定を保証する必要がある。

#### 緑色蛍光蛋白 (GFP)

蛍光蛋白は生細胞における非侵襲的リアルタイム試験用の十分に確立されたツールである。緑色蛍光蛋白 (GFP) は自発性の蛍光蛋白であり、オワンクラゲ (英名: Pacific jellyfish、学名:

*Aequorea Victoria*) またはウミシイタケ (英名: Sea pansy、学名: *Renilla reniformis*) 等の腔腸動物から分離される。

その役割はエクオリンが発する青色の化学発光を、エネルギー変換によって緑色の蛍光に変換することである。

GFP cDNA 分子クローニングおよび機能的トランス遺伝子としての GFP の発現は、細胞生物学、発生生物学ならびに分子生物学に新しい画期的な研究法をもたらし、最終的に、下村 脩、Martin Chalfie、および Roger Y. Tsien は 2008 年にノーベル化学賞を受賞した。

細胞生物および分子生物分野に幅広く使用される GFP 発現細胞の下方測定は最大感度を保持し、滅菌状態の維持するためにフタをしたプレート測定できる。

本アプリケーションノートの目的は、GFP トランスフェクション細胞の検出における新規の Infinite 200 PRO の改善した蛍光下方ファイバーの機能を評価することである。ウェル間の均一性および測定再現性のような測定特性を検討した。

さらに、新規の「Optimal Reading (最適測定) (OR) 機能を、細胞ベースの GFP 測定と組み合わせて検討した。

## 材料および方法

### 細胞および細胞培養

緑色蛍光蛋白 (EGFP) で安定にトランスフェクトしたヒト扁平上皮癌細胞 (A431, ATCC No. 1555) を、L-グルタミン、ピルビン酸ナトリウム、ペニシリン/ストレプトマイシン、HEPES および 5% 熱不活化ウシ胎児血清 (FCS, PAA laboratories) 添加 DMEM 高グルコース (Sigma) 培地中で、湿度のある環境において 37°C および 5% CO<sub>2</sub> の条件下で、コンフルエンスまで増殖培養した。

細胞をトリプシン/EDTA を用いて、増殖フラスコから採取し、新鮮な増殖培地を添加し、下図 (図 1) の細胞密度によるプレートのレイアウトにしたがって、底部が透明な黒色 96 ウェル組織培養プレート (Greiner) 上に播種した。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	20000			5000			500					0 (cell blank)
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

図 1: 再現性測定用に使用したプレートのレイアウト

非トランスフェクション A431 細胞を用いて、プレートレイアウトに表示した細胞数の差を補正し、各ウェルあたりの全細胞数を 20000 個にした。それに応じて、カラム 1~3 には EGFP-トランスフェクション細胞のみが含まれ、カラム 10~12 には非トランスフェクション細胞のみが含まれた。

この細胞混合物を調製し、トランスフェクション効率に応じて、特定の細胞分画のみが蛍光色素分子を有するトランスフェクション実験において見出される細胞の環境と同等の現実的条件を作り出した。37°C および 5% CO<sub>2</sub> の条件下で、一晩中、細胞を接着させた。

### 測定

細胞の増殖培地 (DMEM 高グルコース) 中の細胞サンプルを用いて、最初の一連の実験を実施した。しかし、培養中の pH 指標として担う培地中のフェノールレッドの自家蛍光が強く、蛍光シグナルの検出を大幅に低下させた。したがって、それ以降の測定はすべて、培地を PBS (200 μL/ウェル) で置換した後に実施した。リーダーを予め 30°C に加温し、測定中細胞の最適条件を維持した。フラッシュ回数を変え、蛍光下方測定モードにおいて、全測定を行い、測定の設定を表 1 にまとめる。

Plate definition file	GRE96fb
Measurement mode	Fluorescence Intensity Bottom
Excitation wavelength	483 nm
Excitation bandwidth	9 nm
Emission wavelength	535 nm
Emission bandwidth	20 nm
Gain	Optimal
Integration time	20 μs

表 1: Infinite 200 および Infinite 200 上における PRO の測定設定

### Optimal Read

いくつかの測定は Optimal Read 機能と組み合わせて実施し、その機能は 6 ウェルから 384 ウェルプレートのそれぞれ異なるプレート形式のウェルの底部を全体的にカバーするようにデザインされている。特別な OR (Optimal Read) 機能搭載のこの蛍光下方測定オプションは細胞ベースアッセイを最適化および改善するようにデザインされた。その目標はマイクロプレート内の接着細胞を測定することにより、低 CV 値、ならびにウェル内およびウェル間の高い再現性を達成することであった。

ウェルあたり 20000 個、5000 個、および 500 個の GFP-トランスフェクション細胞、ならびに非トランスフェクション細胞のみから成る「細胞ブランク」を用いて、測定を実施し、ウェルあたりのフラッシュ回数は 4、12、25、または 40 回とした (単回測定)。Optimal Read 機能と組み合わせた場合も、同じフラッシュ合計回数を用いた。

## 結果

### ウェル間の均一性

図 3 に示すように、Infinite 200 との直接比較において、新規の Infinite 200 PRO の蛍光下方ファイバーの直径が大きくなると、ウェル間の均一性が顕著に改善された。この効果は GFP-トランスフェクション細胞数が少ない場合、特に関連性があるように思われ、Infinite 200 PRO は Infinite 200 と比較して、蛍光下方ファイバーが大きく、照明領域が大きいので、より代表的なシグナルが得られる。一方、ウェルあたり 20000 個の GFP-トランスフェクション細胞を用いた場合、CV 値間の差は顕著ではなく、ウェルの底部がシグナル発生細胞に広範囲にかつ均一に覆われているという事実起因し、両ファイバーサイズを用いて、効率的に分析された可能性が考えられる。

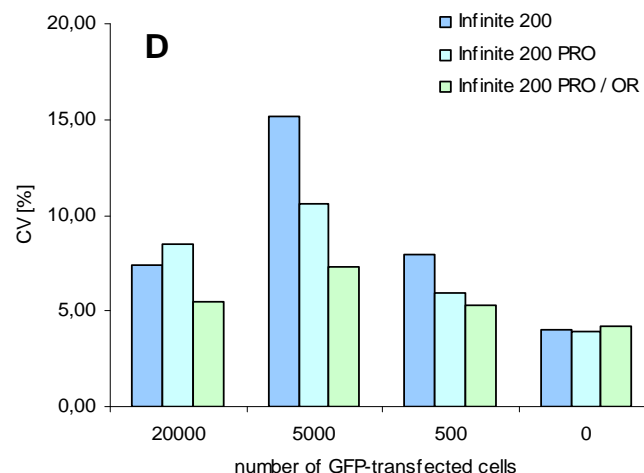
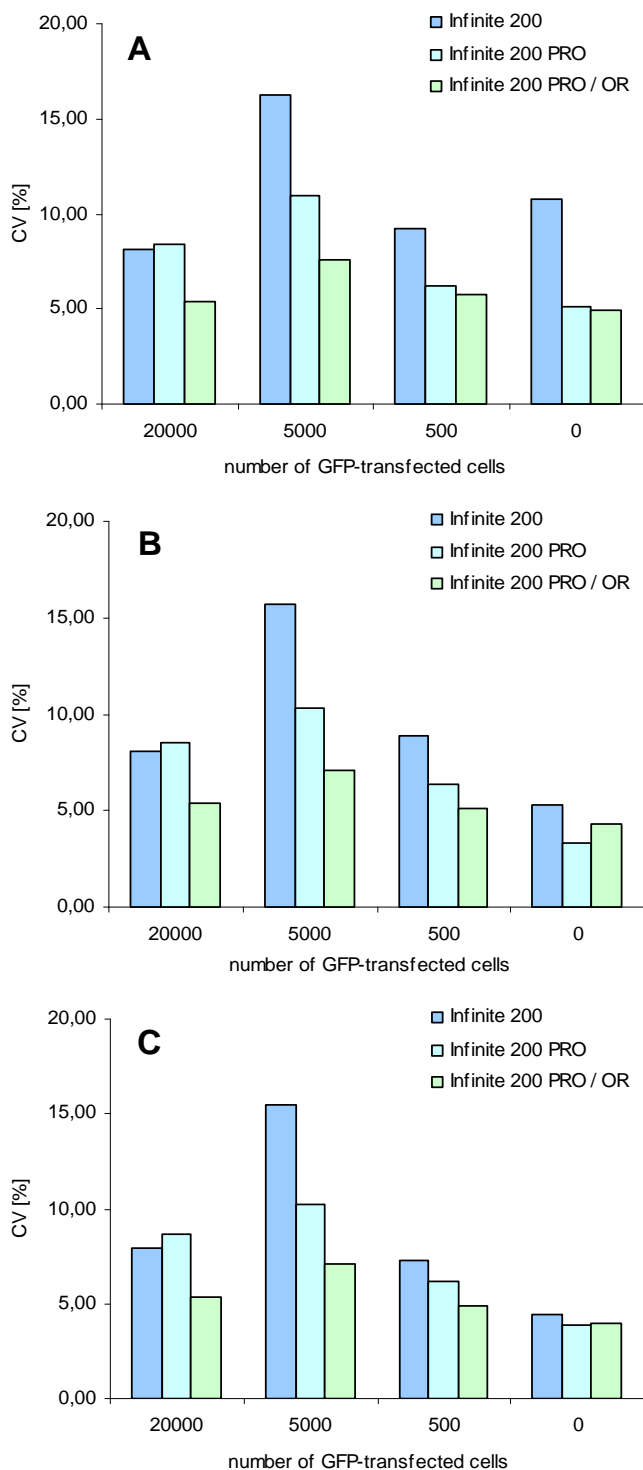


図 2: ウェル間の均一性。(A) ウェルあたり 4 回のフラッシュ、(B) ウェルあたり 12 回のフラッシュ、(C) ウェルあたり 25 回のフラッシュ (デフォルト)、(D) ウェルあたり 40 回のフラッシュ。標準的な蛍光下方オプション搭載 Infinite 200 および蛍光下方測定モジュール搭載 Infinite 200 PRO 上で測定を行い、Infinite 200 PRO / OR は Optimal Read (OR) 機能搭載蛍光下方測定を用いて測定を行った。値は 24 個の複製ウェルのシグナルの平均を示す。

図 2 (A から D) にプロットした CV 値を表 2 にまとめる。

	flashes	20000	5000	500	blank
<b>I200</b> Single Read	4	8,12	16,21	9,24	10,77
	12	8,09	15,68	8,87	5,33
	25	7,96	15,51	7,28	4,43
	40	7,35	15,15	7,91	3,99
<b>I200 PRO</b> Single Read	4	8,38	10,92	6,22	5,11
	12	8,55	10,35	6,35	3,29
	25	8,63	10,27	6,16	3,84
	40	8,54	10,55	5,95	3,92
<b>I200 PRO</b> Optimal Read	4x1	5,37	7,56	5,73	4,95
	4x3	5,40	7,12	5,08	4,30
	4x7	5,31	7,06	4,86	3,92
	4x10	5,46	7,31	5,26	4,20

表 2: Infinite 200 (単回測定 (SR)) および Infinite 200 PRO (SR および OR) 上における FI 下方測定の変動。表示の値は変動係数 (CV) を % で表す。

特に、Infinite 200 PRO を用いて得られた CV 値は、用いたフラッシュ回数に関わらず、ほぼ一定のままだった。

このことから、フラッシュが 4 回という低い回数であっても、ウェル間の均一性はほとんど影響を受けず、ユーザーは妥協のない均一性レベルでフラッシュ回数を減らすことにより、測定速度を加速できる。

一方、単回測定モードにおいて Infinite 200 上で測定した場合、フラッシュ回数を増やすことにより、測定変動の顕著な改善が認められた。Infinite 200 PRO を Optimal Read と組合せたとき、測定変動は最小であり、その CV 値は単回測定モードにおいて Infinite 200 を用いたときの半分のみであった。

### 再現性

ウェル間の均一性に加えて、3 種類の測定機器の設定を用いて、再現性を測定した。

500 個の GFP-トランスフェクション細胞を含むウェルおよびブランクにおいて、最も明らかな改善が認められ、Infinite 200 PRO を Optimal Read と組合せた場合の再現性は Infinite 200 を単回測定と組合せた場合よりも、約 3 倍良好であった。

一方、20000 個/ウェルのサンプルにおける再現率は依然として、ほとんど影響を受けず、これにより、また、ウェルの底部上で GFP-トランスフェクション細胞がさらに均一に分布していることに起因するとみなすことができる(図 3 および表 3)。

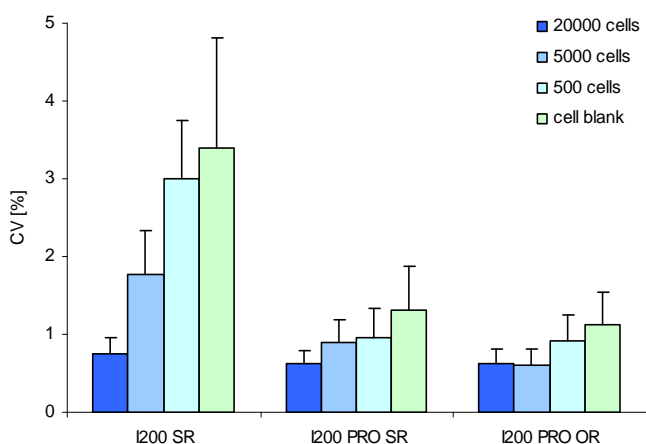


図 3: 再現性の測定。Infinite 200 上で単回測定(SR)において、Infinite 200 PRO 上で単回測定または Optimal Read(OR)において、測定を実施した。値は、測定を 5 回連続で行った 24 個の複製ウェルのシグナルの平均および StDev を表す。CV 値は全 5 回の測定間の変動を示す。

	I200 SR	I200 PRO SR	I200 PRO OR
<b>20000 cells/well</b>	0,76	0,63	0,63
<b>5000 cells/well</b>	1,77	0,90	0,61
<b>500 cells/well</b>	3,00	0,95	0,91
<b>blank</b>	3,39	1,32	1,12

表 3: Infinite 200(SR)および Infinite 200 PRO(SR および OR)上における FI 下方測定の再現性。表示の値は変動係数(CV)を%で表す。

## 考察および結論

Infinite 200 PRO の蛍光下方測定機能は特に、細胞ベースの応用に大きな利点がある。改善した蛍光下方ファイバーの直径が大きくなると、ウェル底部の良好な照明が得られ、均一性が増加するため、より多くの細胞を分析することができる。

これにより、フラッシュ回数が少ない場合においても、ウェル間の測定の均一性が顕著に改善し、良好な測定の再現性が得られる。また、特別な Optimal Read(OR)機能により、均一性がさらに増加し、CV 値が低下し、接着細胞の測定の感度が良好になる。

科学的観点から、フェノールレッドを添加した培地は、強い自家蛍光がサンプルに特異的なシグナルを大部分隠すので、蛍光測定には適さないと考えられる。

細胞ベースの蛍光の最適な検出に関して、フェノールレッド未添加培地を用いること、または PBS 等の適切な緩衝溶液内で測定を行うことを推奨する。

## 謝辞

共同研究中に A431 細胞、ならびに有益なコメントおよび情報をご提供いただきました Univ.Do. Dr. Kristjan Plaetzer (University of Salzburg, Department of Molecular Biology)に感謝いたします。

## 用語

CV	coefficient of variation
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EGFP	enhanced green fluorescent protein
FCS	fetal calf serum
FI	fluorescence intensity
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin ethanesulfonic acid
HTS	high throughput screening
OR	optimal read
PBS	phosphate-buffered saline
SR	single read
StDev	standard deviation

.....  
**Austria** +43 62 46 89 33 **Belgium** +32 15 42 13 19 **China** +86 10 5869 5936 **Denmark** +45 70 23 44 50 **France** +33 4 72 76 04 80 **Germany** +49 79 51 94 170  
**Italy** +39 02 92 44 790 **Japan** +81 44 556 73 11 **Netherlands** +31 18 34 48 174 **Portugal** +351 21 000 82 16 **Singapore** +65 644 41 886 **Spain** +34 93 490 01 74  
**Sweden** +46 31 75 44 000 **Switzerland** +41 44 922 89 22 **UK** +44 118 9300 300 **USA** +1 919 361 5200 **Other countries** +41 44 922 8125  
.....

Tecan Group Ltd.では本文書において正確かつ最新の情報をご提供するよう最善の努力を尽くしておりますが、誤謬や脱漏が生じる可能性があります。したがって、Tecan Group Ltd.では明示的または暗示的にかかわらず、本文書における情報の正確性または完全性につき、何らの表明または保証を行うものではありません。また、本文書は予告なく変更する場合があります。記載された商標はすべて法律によって保護されています。本文書に記載された仕様書の技術的詳細および詳しい手順については、テカンの担当者までご連絡ください。本文書で取り上げたアプリケーションおよび製品は一部の市場で入手困難な場合がありますので、営業担当者にお問い合わせください。

Tecan, Infiniteは主要諸国におけるTecan Group Ltd.(スイス、Männedorf)の登録商標です。

IDEXX Laboratories, Inc. in the United States and/or other countries. Allflex is a trademark or registered trademarks of Allflex UK Ltd. in the United States and/or other countries.

©2010 Tecan Trading スイス、著作権所有