

Spark™ 10M マルチ検出モードリーダーへの AlphaScreen®テクノロジーの実装

AlphaScreen 測定の高感度、均一性、標準的な読取時間

緒言

AlphaScreen は、生物学的相互作用を優れたコスト効率と高い信頼性をもって高速で検出する目的で開発された、ビーズを用いたスクリーニングテクノロジーである。Alpha (化学増幅型ルミネッセンスプロキシミティホモジニアスアッセイ) テクノロジーでは、生物学的に重要な各種の分子と結合可能なドナービーズとアクセプタービーズを使用している。AlphaScreen のドナービーズには、フォトセンシタイザー分子であるフタロシアニンが組み込まれている。この分子は、高エネルギー光源 (680 nm) により励起し、周囲の酸素を一重項酸素に変換する。一重項酸素分子は約 4 μ s の半減期を持ち、その間に溶液中を最長で 200 nm 拡散する。AlphaScreen のアクセプタービーズがドナービーズに近接すると、結合反応が生じる。それにより一重項酸素分子は連続的なエネルギー転移ステップを開始し、最終的に 520~620 nm の強力な発光を生じうる。この信号を増幅することにより、少量の生物検体でも検出が可能となる(1)。

AlphaScreen Omnibeads は、AlphaScreen 対応検出装置の定期的な品質試験やリーダーの標準化、校正用として設計された、コスト効率に優れた使用しやすいツールである。

AlphaScreen 信号の生成に必要な化学は、全て 1 種類のビーズ内に組み込まれている。

Tecan の新型マルチ検出モードリーダー Spark 10M には、改良型検出モジュールが組み込まれている。このモジュールは、AlphaScreen ドナービーズの励起に最適な高出力レーザー光源、ならびに AlphaScreen、AlphaLISA®、AlphaPlex™、将来的な新型 Alpha テクノロジー用途に使用する発光信号の超高感度検出用として完璧な機能を発揮するように事前に最適化したフィルタセットで構成されている(2)。さらに Tecan が確立した技術であるリアルタイム温度補正機能を搭載しており、マイクロプレート全体でのサンプル温度の変化を補正することができる(3)。また Spark 10M には、直感的に使用しやすいソフトウェアソリューションと Alpha テクノロジー用に事前に最適化した測定プロトコルも搭載しており、性能を低下させることなく、AlphaScreen、AlphaLISA、AlphaPlex の各アッセイを確実に実施することができる。

このテクニカルノートでは、Spark 10M マルチ検出モードリーダーへの AlphaScreen 実装の成功、ならびに測定感度、均一性、標準的な読取時間に関する機器の性能について説明する。

材料および方法

- Spark 10M マルチ検出モードリーダー (Tecan、オーストリア)
- AlphaScreen Omnibeads (PerkinElmer、米国)
- リン酸緩衝食塩水 (PBS)
- 384 ウェル白色低容量マイクロプレート (Greiner Bio-One、ドイツ)

代表的な化学としてOmnibeadsを使用し、発生させた検出可能な最小信号を測定し、AlphaScreenの感度を評価した。製造業者の説明書(4)に従ってOmnibeadsを使用し、コンポーネントの光退色を防止するため遮光条件 (50ルクス未満) 下でピペット操作を行った。すなわち、まずOmnibeads希釈液 (1:2) を調製し (濃度範囲2.44~20,000 ng/ml)、次に濃度ごとに溶液を複製し、ピペットを使用して384ウェル低容量マイクロプレート (20 μl/ウェル) に5回分注した。またOmnibeadsを添加していないPBSを含むブランクサンプルも用意した。さらに濃度10,000 ng/mlのOmnibeads希釈液を複数用意し、個々のマイクロプレートに分注してAlphaScreen測定の一貫性を評価した。測定については、表1に示す設定値を用いて、AlphaScreenモードで実施した。

測定パラメータ	
プレート定義	Greiner384sw
励起時間	100 ms
積分時間	300 ms
積分波長	520~620 nm
温度補正	あり
出力	計数/s
処理時間	0 ms

表 1 AlphaScreen の測定条件

Omnibeads の最終濃度に対してブランク補正平均値をプロットし、切片を 0 に設定した近似直線を加えた。y 値としてブランクの標準偏差を使用し、近似式 $y = kx$ から検出限界を求めた。

アッセイの一貫性を求めるため、式 1 を用いて CV を計算した。

$$\% CV = \frac{stdev \times 100}{\text{平均値}}$$

% CV 変動係数 (%)
 stdev 信号の標準偏差
 平均値 信号の平均値

式 1: アッセイの一貫性の計算

結果

感度および直線性

Spark 10M は、濃度 1.6 ng/ml 以上の Omnibeads を検出する能力を備えている (直線性 0.9999 (R^2 値)、信号ブランク比 1.154:1 (図 1))。

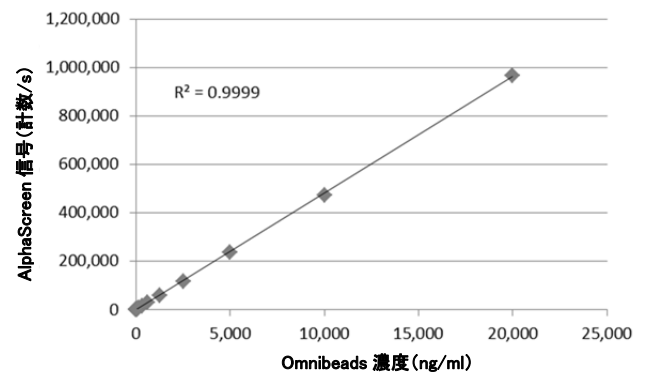


図 1 AlphaScreen の感度

均一性

Omnibeads 希釈液 (10,000 ng/ml) の複製を 50 ウェル以上作成し、384 ウェルプレートに分注した。測定により、信号の一貫性に関して CV わずか 2.2% という極めて優れた結果が示された。このことは、Spark 10M が有意な測定変動を生じることなく、AlphaScreen 信号を検出する能力を備えていることを示している (図 2)。

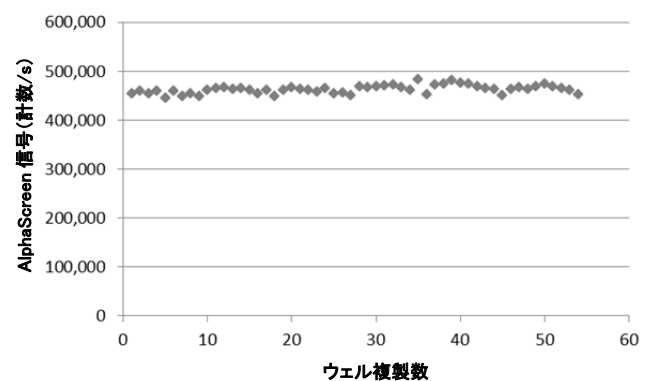


図 2 AlphaScreen 測定における均一性

読取時間

各種フォーマットのマイクロプレートに対する AlphaScreen の総読取時間には、励起時間、積分時間、ならびに温度補正機能の適用に要する時間が含まれている。一般に Alpha 測定用として推奨される標準設定を使用した場合、384 ウェルプレート全体の読取に要する時間は 4 分 28 秒である (励起時間 100 ms、積分時間 300 ms)。温度補正機能を有効にした場合、信号測定と並行して赤外線による温度評価を実施するため、測定時間が若干長くなる。そ

のため、個々のフォーマットのマイクロプレートに対する読取時間が約 20%長くなる。ただし総読取時間については、各用途要件に対して最適化を行い、短縮した励起期間と発光期間を使用(励起時間と積分時間の双方について 10 ms まで短縮)することにより、大幅に短縮することができる。

表 2 に、96 ウェルプレートと 384 ウェルプレートに対する AlphaScreen 読取時間の概要を示す。

(A) 温度制御あり		
	推奨設定値	設定可能な最短値
96 ウェルプレート	1:31 分	0:47 分
384 ウェルプレート	4:28 分	1:36 分
(B) 温度制御なし		
	推奨設定値	設定可能な最短値
96 ウェルプレート	1:17 分	0:40 分
384 ウェルプレート	3:44 分	1:19 分

表 2: 各種フォーマットのプレートに対する AlphaScreen 読取時間(温度補正あり/なし)。推奨設定値を(励起時間と積分時間を最小限に抑えた)設定可能な最短値と比較した。

結論

Spark 10M の改良型検出モジュールは、96 ウェルマイクロプレートと 384 ウェルマイクロプレートの両フォーマットにおいて、AlphaScreen アッセイの感度や均一性などの重要な品質面で優れた性能を発揮する。Tecan が確立した専有技術である温度補正機能を利用すれば、アッセイの性能をさらに改善することが可能となる。しかもこの場合、測定前に長時間を費やしてサンプルの温度平衡を達成する必要がない。

この新型 Alpha テクノロジーモジュールと、確立された Spark 10M の検出モードを併せて使用すれば、研究、アッセイの開発、ハイスループットスクリーニングに優れた性能を発揮することができる。

略語

Alpha	化学増幅型ルミネッセンスプロキシミティ ホモジニアスアッセイ
CV	変動係数
PBS	リン酸緩衝食塩水
stdev	標準偏差

参考文献

- (1) A Practical Guide to Working with AlphaScreen.
http://www.urmc.rochester.edu/hts/_source/alphascreenpracticalguide.pdf
- (2) Technical note: Unparalleled flexibility for luminescence detection with the Spark 10M multimode reader. 398597 V1.0. 12-2014.
- (3) Technical note: New Infinite[®] M1000 PRO with AlphaScreen module. 396981 V1.0. 11-2011.
- (4) Using the AlphaScreen Omnibeads.
www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-73451MAN_AlphaScreenOmnibeads.pdf

※このテクニカルノートは Tecan (本社 スイス) が発行 (原文 英語) し、テカンジャパンが日本語翻訳したものです。翻訳文の表現等に疑義が生じた場合は、原文をご参照ください。

Australia +61 3 9647 4100 Austria +43 62 46 89 33 Belgium +32 15 42 13 19 China +86 21 2206 3206 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 Singapore +65 644 41 886 Spain +34 93 595 95 25 31
Sweden +46 31 75 44 000 Switzerland +41 44 922 81 11 UK +44 118 9300 300 USA +1 919 361 5200 Other countries +43 62 46 89 33

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で保護されています。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。

記載された商標はすべて法律で保護されています。本文書に記載された商標とデザインは、Tecan Group Ltd.(スイス Männedorf)の商標または登録商標です。完全なリストは www.tecan.com/trademarks で参照できます。リストには含まれませんが、ここに記載されている製品名および会社名はそれぞれの所有者の商標である場合があります。

Tecan は、Tecan Group Ltd.(スイス Männedorf)の登録商標です。Spark、SparkControl、Fusion Optics および Quad4 Monochromators は同商標です。

Spark 10M は研究用途向けです。診断用途ではご使用いただけません。

© 2015 Tecan Trading AG スイス 著作権所有 免責事項と商標については、www.tecan.com をご覧ください。

www.tecan.com www.tecan.co.jp/spark