

新 Spark™ 10M AlphaScreen®モジュール

AlphaScreen を利用した Spark 10M によるチロシンキナーゼ活性の検出

緒言

AlphaScreen は 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) テクノロジーの一種であり、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システムである。このシステムでは、ドナービーズとアクセプタービーズとの間のエネルギー転移を利用している。すなわち、ドナービーズとアクセプタービーズが近接するとカップリングパートナー間で結合反応が生じ、ビーズ間でエネルギー転移が生じる。それにより、波長 520~620 nm の強い発光信号が生じるのである(1)。

チロシンキナーゼは、シグナル伝達、細胞増殖、アポトーシスなどの細胞作用の重要なメディエータである。この物質は過剰細胞増殖(アテローム硬化症、癌など)を伴うさまざまな疾患に関与していることが報告されており、そのため医薬品開発やハイスループットスクリーニング(HTS)における標的となることが多い。AlphaScreen P-Tyr-100 アッセイは、キナーゼ活性を高感度で確実に検出する目的で開発された手法である。AlphaScreen 信号はチロシンキナーゼリン酸化反応レベルに依存して変化し、リン酸化レベルが高いほど強度が高くなる(2)。

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。このモジュールは高出力レーザー光源、ならびに AlphaScreen、AlphaLISA®、AlphaPlex™ アッセイの超高感度検出用ルミネッセンスフィルタホイールが組み込まれている。さらに Spark 10M には Tecan が確立した技術であるリアルタイム温度補正機能が搭載されており、それによ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し(3)、Alpha テクノロジーアッセイの性能を損なうことなく、確実に発揮することができる。

このアプリケーションノートでは、Spark 10M リーダーへの AlphaScreen テクノロジーの実装、ならびに AlphaScreen P-Tyr-100 アッセイキットを用いたチロシンキナーゼ活性の検出について説明する(2)。

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)
- P-Tyr-100 アッセイキット (PerkinElmer、米国)
- 384 ウェル白色低容量マイクロプレート (Greiner Bio-One、ドイツ)

製造業者の説明書に従い、P-Tyr-100アッセイキットを使用した。コンポーネントの光褪色を防止するため、遮光条件 (50ルクス) 下でAlphaScreen試薬のピペット操作を行った。すなわち、ビオチン化・リン酸化LCKペプチド (bio-LCK-P) の希釈系列 (0.01~30 nM) を調製した後、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 μ l/ウェル) に5回分注した。また bio-LCK-P を含有しないアッセイ緩衝液もブランクサンプルとして用意した。AlphaScreenドナービーズとアクセプタービーズを作業濃度 10 nM まで希釈し、アッセイ用プロトコルの説明に従って事前に混合した上でサンプルウェルとブランクウェルに添加した。また濃度 10 nM の bio-LCK-P 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。プレートを室温にて3時間、暗所でインキュベートした後、表1に概要を示す設定値を用いて測定した。

測定パラメータ	
プレート定義	GRE384sw
励起時間	100 ms
積分時間	300 ms
アプリケーション	AlphaScreen
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

結果

図 1 に、Spark 10M を用いて測定した bio-LCK-P 希釈系列の AlphaScreen 信号を示す。測定した信号曲線は P-Tyr-100 キット説明書に記載の標準曲線と同様の形状・変化を示しており、特に低濃度領域の標準偏差が非常に小さくなっている。一般に、この場合の bio-LCK-P の検出限界は 100 amol/ウェル以下となる。 Z' 計算値 (0.91) は、アッセイの品質が優れていることを示している(4)。

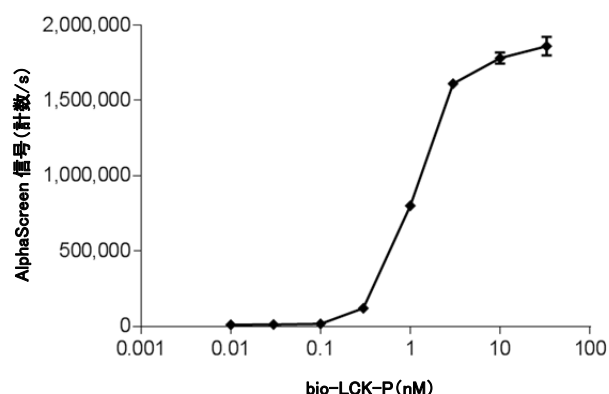


図 1: bio-LCK-P 希釈系列から作成した標準的な AlphaScreen 信号曲線。

AlphaScreen の均一性に関する測定結果から、ウェル間の変動が極めて小さい (CV: 2.7%) ことが明らかになった。このことは信号の一致度が高いことを示している (図 2)。

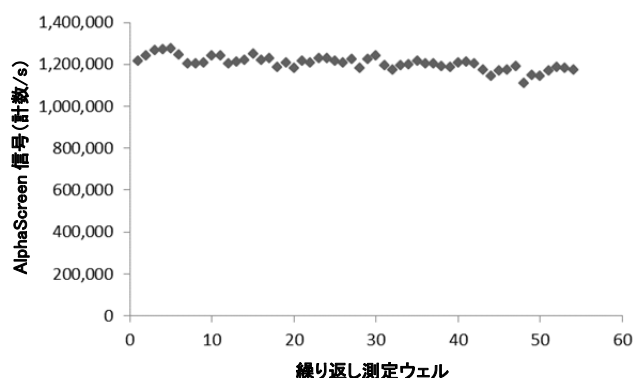


図 2: bio-LCK-P 希釈液 (10 nM) を用いた AlphaScreen 測定の一貫性。

結論

本アプリケーションノートに概説した結果から、P-Tyr-100 などの AlphaScreen アッセイに関して Spark 10M リーダーが優れた性能を備えていることが明らかになった。この装置では bio-LCK-P の検出限界 100 amol/ウェル以下を達成し、また測定変動は極めて小さく(CV: 3%未満)、Z' 値は高い値(0.9 以上)を示している。

本機器の Alpha テクノロジー用改良型検出モジュールと独創的な温度補正機能を併せて使用すれば、研究、アッセイの開発、HTS 用途に関する再現性の高い AlphaScreen 測定を高速かつ高感度で行うことができる。

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
bio-LCK-P	ビオチン化・リン酸化 LCK ペプチド
CV	変動係数
HTS	ハイスループットスクリーニング

参考文献

- (1) A Practical Guide to Working with AlphaScreen
http://www.urmc.rochester.edu/hts/_source/alphascreenpracticalguide.pdf
- (2) AlphaScreen P-Tyr-100 Assay Kit instructions
(PerkinElmer, #6760620)
- (3) Technical Note: New Infinite[®] M1000 PRO with AlphaScreen module. 396981 V1.0. 11-2011
- (4) Zhang *et al.* A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen.* 1999, 4(2): 67-73

※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