

Optimization of

temperature-sensitive assays

using the Spark® Te-Cool™.



測定チャンバー温度を 18°Cまで冷却し維持できるマルチモードリーダー用冷却モジュールで重要な実験条件を管理



緒言

学術研究の成果はさまざまな要素に左右される。したがって、信頼性と再現性の高い結果を得るためには、温度をはじめとする環境要因などの安定した実験条件を定義、設定することが極めて重要である。広く知られていることであるが、ファント・ホッフの式¹で説明されるように、化学反応の速度は温度に大きく依存する。しかし、世界各地の実験室の温度は、気候や季節によっても、1日の中でも変動する(図 1)。

マルチモードリーダーは、エンドポイント測定およびカイネティック測定で広く使われているツールであるが、測定チャンバー内部の温度は必ずしも室温に等しいとは限らない。特に一定時間リーダーを使用すると、内部の電子回路の影響でチャンバー温度が室温より4℃も高くなることがある。

これまで、温度制御によりマルチモードリーダーを加熱することはできても、室温以下に設定することは不可能であった。したがって、酵素アッセイなど温度に左右されやすい実験において、実験結果の経時的な再現性に影響が生じる可能性がある。また、たとえ数分間であっても測定中にプレートが加熱されることで、実験の精度が低下するおそれがある。

マルチモードリーダー用としては初めての冷却モジュールである Te-Cool なら、この問題に対処することができる。ユーザが定義する温度(18℃~42℃)に測定チャンバーを冷却し維持することで、世界中どこでも、季節を問わず、あらゆる実験室で常に一定の実験条件を保証してくれる無類の装置である。

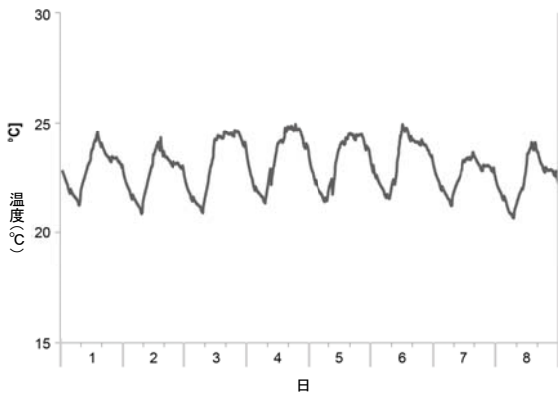


図 1: 実験室の温度変化の例

4℃前後の変動があり、日中は夜間よりも気温が高い。

材料および方法

酵素アッセイのシグナル強度の温度依存性

発光キナーゼアッセイを用いて、酵素の温度依存性を評価した。ルシフェラーゼを含む反応緩衝液に超高純度な ADP を添加し、384 ウェルプレートの各ウェルの周辺部と中央にそれぞれ反応混合物 20 µl をピペットで分注した(プレートレイアウトは図 2 を参照)。ウェルの残りの部分は水を充填した。

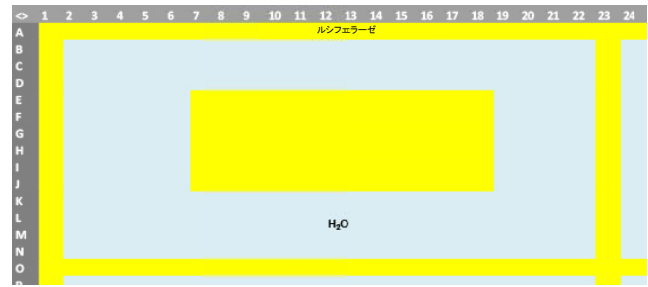


図 2: 384 ウェルプレートを用いたグロー発光測定における分注。ウェルの黄色の部分にルシフェラーゼと反応緩衝液を充填、青色の部分に水を充填した。

室温(22℃)で 10 分以上かけてプレートを平衡化させた上で、Spark 20M リーダーを用いて異なる温度(18℃、22℃(室温)、26℃、30℃)でエンドポイント法およびカイネティック法により最大 10 分間、発光シグナルを測定した(表 1)。

測定パラメータ

プレート	Greiner® Bio-One 384 平底型白色マイクロプレート[GRE384sw]
温度	18℃、22℃(室温)、26℃、30℃
測定モード	発光
減衰	自動
処理時間	0 ms
積分時間	200 ms
出力	計数/秒

表 1: 発光シグナル測定のための機器設定値



温度依存性がある酵素の安定性

酵素アッセイに関するもう1つの重要な点は、酵素の安定性である。温度上昇に伴い酵素の安定性が低下することを示すために、ウミシイタケ由来 (Renilla reniformis) およびホタル由来 (Photinus pyralis) の高純度ルシフェラーゼを用いて連続アッセイを実施し、測定を行った。96 ウェルプレートの各ウェルにルシフェラーゼを分注して、Spark 20M リーダーに投入した。各温度 (18°C、22°C (室温)、26°C、30°C) に設定し、対応する基質を 100 μ l 注入した直後 10 秒間の各ルシフェラーゼの発光シグナルを連続的に検出した (表 2)。

測定パラメータ

プレート	Greiner® Bio-One 96 平底型白色マイクロプレート [GRE96fw_chimney]
温度	18°C、22°C (室温)、26°C、30°C
ウェル毎の測定	
測定モード	発光、ウェル毎
ラベル 1 - ルシフェラーゼ 1 (ホタル由来)	
注入	インジェクターA、基質 1 100 μ l、200 μ l/秒、注入後に補充
待機時間	3 秒
測定モード	発光
減衰	自動
積分時間	10,000 ms
処理時間	0 ms
出力	計数/秒
ラベル 2 - ルシフェラーゼ 2 (ウミシイタケ由来)	
注入	インジェクターB、基質 2 100 μ l、200 μ l/秒、注入後に補充
待機時間	3 秒
測定モード	発光
減衰	自動
積分時間	10,000 ms
処理時間	0 ms
出力	計数/秒

表 2: 2 種類のルシフェラーゼアッセイの発光シグナルを連続して測定したときの機器設定値

結果

酵素アッセイのシグナル強度の温度依存性

酵素反応の転化率は温度に依存することが多く、高温になるほど反応速度が大きくなる。この挙動を確認するため、典型的な発光キナーゼアッセイを用いて、異なる温度でグロー発光におけるルシフェラーゼの活性を測定した (図 3)。温度が 1°C 上昇するごとに、発光シグナル強度は約 10% 増加した。

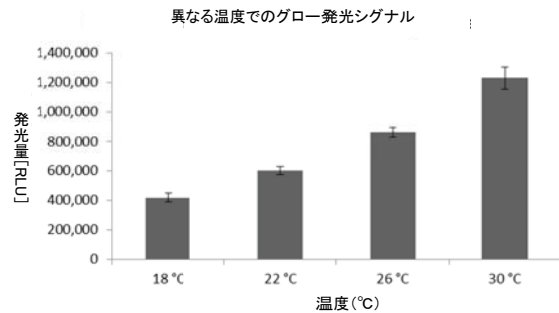


図 3: 代表的なルシフェラーゼのグロー発光シグナル。温度上昇に伴いシグナル強度が増すことから、温度依存性があるといえる。

カイネティック測定では、プレートおよび Spark 20M をともに室温で平衡化した場合、プレートの発光シグナルは一定となった (図 4A)。リーダー内部の温度を高くすると、プレートが加熱されることにより、初期値と比較して発光シグナルの強度が増した。384 ウェルプレート全体の測定時間に匹敵するわずか 6 分間の間でも、発光シグナルは室温より 4°C 高いと 34%、8°C 高いと 78% も増加した。一方、Spark 20M を室温で操作した場合のシグナル強度は 2% 低下した。さらに、測定結果の変動係数 (CV) は、高温になるほど著しく増加した (図 4B)。



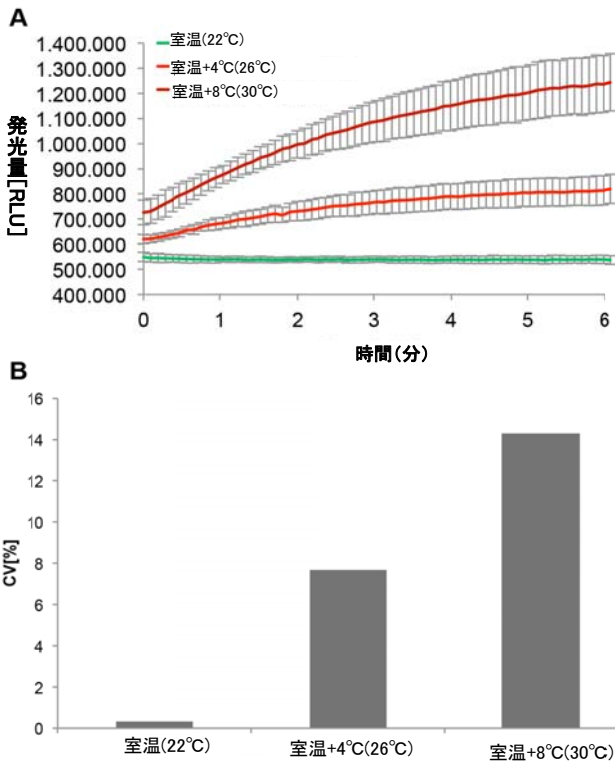
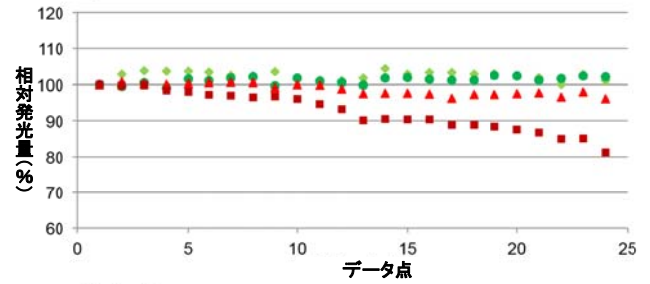


図 4: カイネティック測定における発光シグナルの経時的変化。6 分間の測定中にウェル内部の液体が加熱されたことで発光シグナルが増加し (A)、その結果シグナルのばらつきが大きくなり、測定結果の変動係数も高くなった (B)。

温度依存性がある酵素の安定性

アッセイ温度が必ずしも酵素活性に影響を及ぼすとは限らない。温度が異なると転化率も異なる酵素もあれば、安定性が低下する酵素もある。この点を実証するために、リーダーの温度を変えてウェル毎に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を連続的に検出、測定した。比較的長い積分時間を要するアッセイプロトコルであったため、1 ウェルの測定に約 30 秒を要し、96 ウェルプレート全体の測定に約 45 分かかった。図 5 から、ホタルルシフェラーゼの発光シグナルは時間とともに減少することが分かる。これは高温 (特に 30°C) ではタンパク質が不安定になるためである (A)。一方、ウミシイタケルシフェラーゼは、Spark リーダー内部の温度変化による影響を受けなかった (B)。複数のプレートウェルにおける変動係数を比較すると、温度が酵素活性に影響を及ぼしていることがよくわかる (図 6)。

A) ホタルルシフェラーゼ



B) ウミシイタケルシフェラーゼ

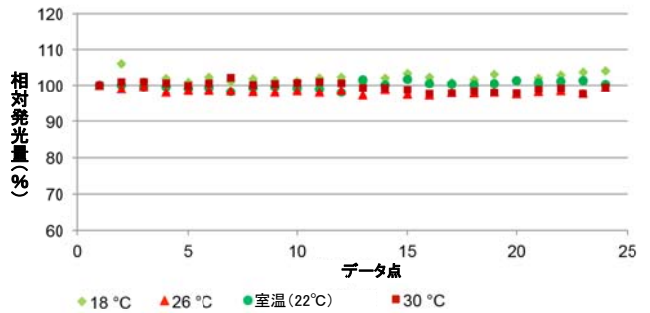


図 5: ホタルルシフェラーゼおよびウミシイタケルシフェラーゼを用いたアッセイの発光シグナルの連続測定。温度上昇に伴い、ホタルルシフェラーゼの活性は低下するが (A)、ウミシイタケルシフェラーゼのシグナルは一定である (B)。

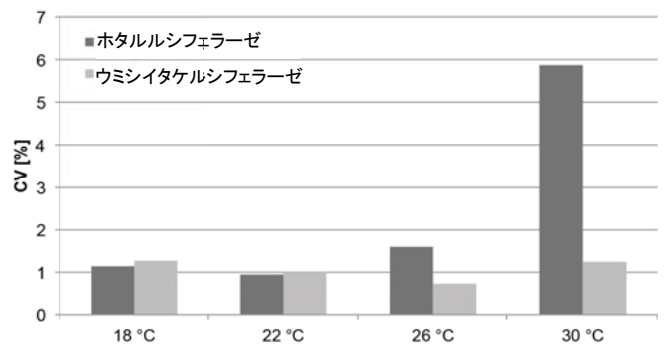


図 6: ホタルルシフェラーゼは 30°C における変動係数の値が高いことから、温度の影響を受けて活性が低下することが分かる。



結論

本アプリケーションノートのデータから、化学反応全般、とりわけ酵素アッセイにおいて、温度は重要なパラメータであることが確認された。本書では、3種類の酵素を例に、酵素活性の温度依存性の可能性を検証した。このうち2種類は温度変化の影響を強く受け、活性の変化または安定性の低下を生じた。このことから、最適なデータ品質を確保するためには、実験時の温度管理が不可欠であるといえる。

Spark マルチモードリーダー用冷却モジュール Te-Cool は、リーダーの加熱だけでなく、室温以下の冷却が可能な装置である。Te-Cool を使えば、アッセイ要件を満たす条件を厳密に定義できるため、個々の測定結果の再現性および精度の向上につながり、実験品質が高まる。いつでも、どのラボでも、季節を問わず世界中どこでも、最適な結果を約束してくれる無類のモジュールといえよう。

略語

CV 変動係数

参考文献

- 1) Atkins, Peter; De Paula, Julio (10 March 2006). Physical Chemistry (8th ed.). W.H. Freeman and Company. p. 212. ISBN 0-7167-8759-8

※このアプリケーションノートは 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 28 98 63 33 **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 93 490 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 20M は研究用途向けです。

© 2016 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

399011 J V1.0 03-2016

