

プレートリーダー論： プロメガが求め、磨き上げる、真のスペック

マイクロプレートを用いたアッセイに多く用いられる測定法として、吸光度、蛍光、発光を用いた方法が一般的です。それぞれの測定技術は、試薬および装置の発展のもと、それらを最大限利用することにより、使いやすいものになります。ルシフェラーゼを用いた発光の場合、本来は発光時間が一瞬であったものを長時間光らせるという工夫が試薬の大きな発展であり、また装置はより高感度の測定が可能な検出器を利用することなどが挙げられます。

プロメガが考える優れた検出システムとは？

- **優れた装置** ▶ 最適化が不要で、すぐに信頼できる正確なデータが得られること
- **優れた試薬** ▶ サンプルに影響を与えず、より簡単により多くの情報が得られること

今回は発光アッセイを最大限に利用するために有効な、高感度、ワイドダイナミックレンジ、低クロストークについて考えます。

「高感度」について

プロメガの発光試薬はどのルミノメーターでも測定できるように発光シグナルを大きくするように設計されていますが、試薬側の改良に限界があるのも事実です。典型的なものがレポーターアッセイであり、細胞内タンパク質の発現検出を得意とするルシフェラーゼレポーターと蛍光レポーター GFP をプレートリーダーで測定するとルシフェラーゼの感度の良さがわかります(右図)。しかし、感度の高いレポーターを選択しても細胞数、トランスフェクション効率などにより発現量自体が少なければ試薬の性能ではカバーできない場合もあります。このような場合でも高感度な検出装置であれば結果を得ることができますが、低感度装置では十分なシグナルが得られないため実験条件の見直しに時間を割かなければなりません。プロメガはこのような問題を回避するために、フォトンカウンティング法を採用し、高感度化を実現しました。

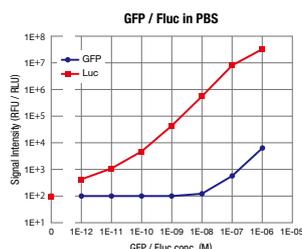


図 1. GFP と Fluc の発光強度の比較
GFP および Fluc の PBS 溶液を GloMax® で測定した。GloMax® 以外の装置でも同様の結果を得た。

「ワイドダイナミックレンジ」について

新しいアッセイ系のため発光量が予想以上に高く検出限界を超えてしまうなど、先の「高感度」とは逆のケースを考えます。このような場合はアッセイを見直すのが一般的ですが、ダイナミックレンジが狭い装置では Gain を変えることにより測定を可能にする方法もあります。Gain の変更は一見良さそうですが、実験を変更する度に Gain を調整する必要があります。また、装置によっては、最大発光ウェルを指定して Gain をアジャストすることにより測定しますが、実際には指定したウェルより高発光量のウェルがあると検出上限を超え、そのウェルは諦めるか、再度 Gain 調整しなければならないなど煩わしさがあります。プロメガのルミノメーターでは高発光量時には電流測定法、微量検出時には最高感度が得られるフォトンカウンティング法を併用し、ダイナミックレンジ8桁以上を実現しました。ダイナミックレンジの広い測定器なら発光量の高いサンプルを希釈したり、機器の調整などを行うことなくすぐに測定することが可能なのです。

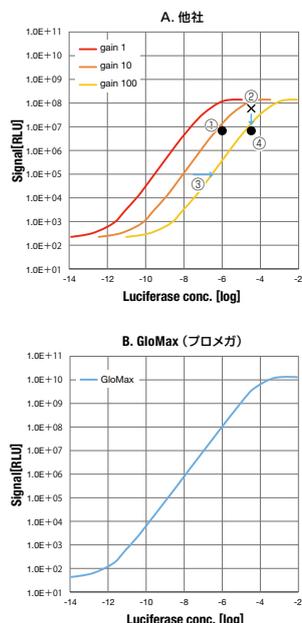


図 2. GloMax® のダイナミックレンジと他社装置のゲイン調整イメージ
パネル A. ユーザー指定の最大発光ウェル①に合わせて gain を 10 (オレンジ) に設定、測定上限を超えるウェル②が存在した場合、Gain を 100 に変更③することによりウェル②が測定範囲内に入り測定ができる④。パネル B. GloMax® は 8 桁以上のダイナミックレンジがあり、Gain 調整の必要がありません。

長時間発光 (グロータイプ) を生じる試薬が開発され、ハイスループットスクリーニングに適した高感度アッセイとして幅広い用途に使われるようになりましたが、測定していない隣のウェルの光までも測定してしまうクロストークというグロータイプ発光特有の問題も同時に生まれました(右図)。プロメガではこれを装置側で防ぐためにドームマスキング/デュアルマスキング方式を開発し、クロストークを最小限に押さえることに成功しました。クロストークは左上右下斜めの少なくとも 8 ウェルからの影響があり、これを計算で補正することは容易ではありません。そういったことから、クロストークの少ない装置を用いることはとても重要です。

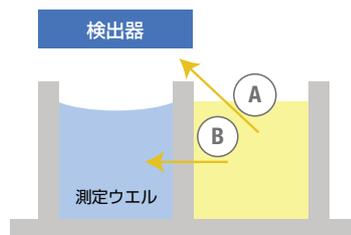


図 3. クロストークの説明
A. 隣のウェルから直接検出器に届くクロストーク
B. plate の壁を通して測定ウェルを光らせるクロストーク

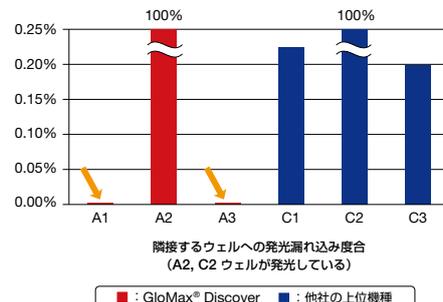


図 4. プロメガのマスキングシステムによるクロストークの低減

お客様の声

RentaMAX で機械選びの大切さを実感

東京大学大学院 農学生命科学研究科
応用生命化学専攻 栄養化学研究室
小島 拓哉 先生



種々の遺伝子断片を組み込んで、いざレポーターアッセイを行っても、必ずしも期待通りの結果が得られず、頭を抱えてしまうことが今までに多々ありました。何が問題か、コンストラクト?、使用している細胞?、トランスフェクション効率?、などと逐一検証し、期待される(?) 結果に結びつくよう試行錯誤しましたが、大元、ルミノメーターの性能に関しては、頭の片隅に追いやって使用しておりました。

こうした中で、RentaMAX を通じて GloMax® Discover を使用する機会を得、これは試しにと、なかなか再現性が得られなかったアッセイ系を再検討した結果、微量な差異を再現性良く検出することが出来ました。今までの再検証に掛かった時間を嘆くとともに、GloMax® を用いたアッセイ結果から次への検証を進める実験が組める、ちょっとしたワクワク感も得られ、機械選びはやはり大切だなと実感した次第です。

ダイナミックレンジが広い事、発光、蛍光、吸光測定への対応性、欲を言えば切りがなくなりますが、一台でこれらの点をカバーする GloMax® Discover の利便性は、新たなアッセイ系を組み立てる際にとっても有効であり、実験を進める上で賢い選択になると思われます。ということで新たな実験を進めたいと思います。

「低クロストーク」について

フラッシュタイプのルシフェラーゼアッセイ試薬を使いやすくするために、



RentaMAX プログラムを通じて、プロメガのルミノメーターのパフォーマンスをすぐに体験いただけます。

RentaMax

検索