

Technical Note No.1

PrimeSurface®白色プレートを用いた 細胞内ATP測定

【目的】

PrimeSurface®白色プレートでは下記に示しましたようにスフェロイド形成→薬剤暴露→発光測定によるバイアビリティーアッセイまでを試薬を移し替える必要なく、同じウェルで実施できます(One-Pot アッセイ)。

このことにより、薬剤評価時間を短縮し、より正確な薬効評価が可能となります。

そこで本テクニカルノートでは、各種細胞における細胞増殖曲線とPromega社製ATPアッセイ試薬CellTiter-Glo®を用いたATPの定量測定方法をご紹介します。

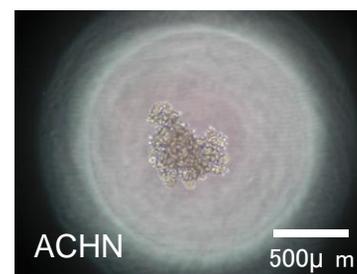
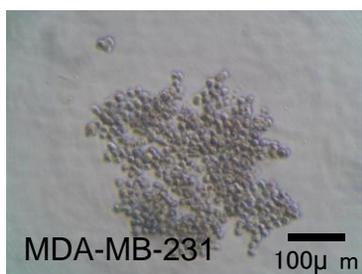
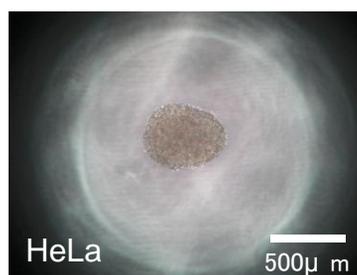
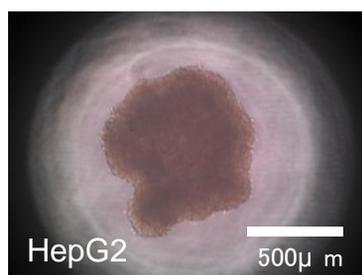


(注) 上記の数値は代表値であり保証値ではありません。

【実施例】

CellTiter-Glo[®]では、ライセートバッファーにより細胞からきちんとATPが溶出し、溶出したATPと発光試薬が反応する必要があります。そこで、本実験では、スフェロイドの堅さの異なる下記の4種類の細胞を代表例として使用致しました。

堅さ	細胞名	由来
強い	HepG2	Human Hepatic Cancer Cell Line
中程度	HeLa	Human Cervical Cancer Cell Line
弱い	MDA-MB-231	Human Breast Cancer Cell Line
弱い	ACHN	Human Renal Adenocarcinoma Cell Line



● 試薬および資材

培地：RPMI1640 (+10%FBS + 1%Penicillin-Streptomycin Mixed Solution)

CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay Cat. No. G7572 (Promega Co., Ltd.)

PrimeSurface[®] 96ウェル透明プレート (MS-9096U, Sumitomo Bakelite Co., Ltd.)

PrimeSurface[®] 384ウェル透明プレート (MS-9384U, Sumitomo Bakelite Co., Ltd.)

PrimeSurface[®] 384ウェル白色プレート (MS-9384W, Sumitomo Bakelite Co., Ltd.)

● 使用機器

プレートリーダー：Fusion α -FP (Perkin Elmer Co., Ltd.)

(注) 上記の数値は代表値であり保証値ではありません。

【細胞増殖曲線】

< 手順 >

4枚のプレート(1, 3, 5, および7日目用)に250, 500, 1000cell/wellの3播種数で各プレートに播種した(使用プレート: PrimeSurface[®] 384ウェル白色プレート MS-9384W, 培地量: 25 μ L/well)^{注1)}。

播種後, 5%CO₂インキュベーターで培養し, 1日目から7日目まで1日おきにATPアッセイ薬を各wellに25 μ Lずつ添加し, ピペッティングや攪拌はせずに10分間静置後^{注2)} Perkin Elmer製プレートリーダーFusion α -FPで発光量を測定した。平均値をFig.1に示した。

注1) 培地量は, 細胞の種類, 播種数, 培地など培養条件に応じて適宜調整ください。

注2) 細胞の溶解性が悪い場合は, 適宜シェーカーを使用して細胞を溶解させてください。

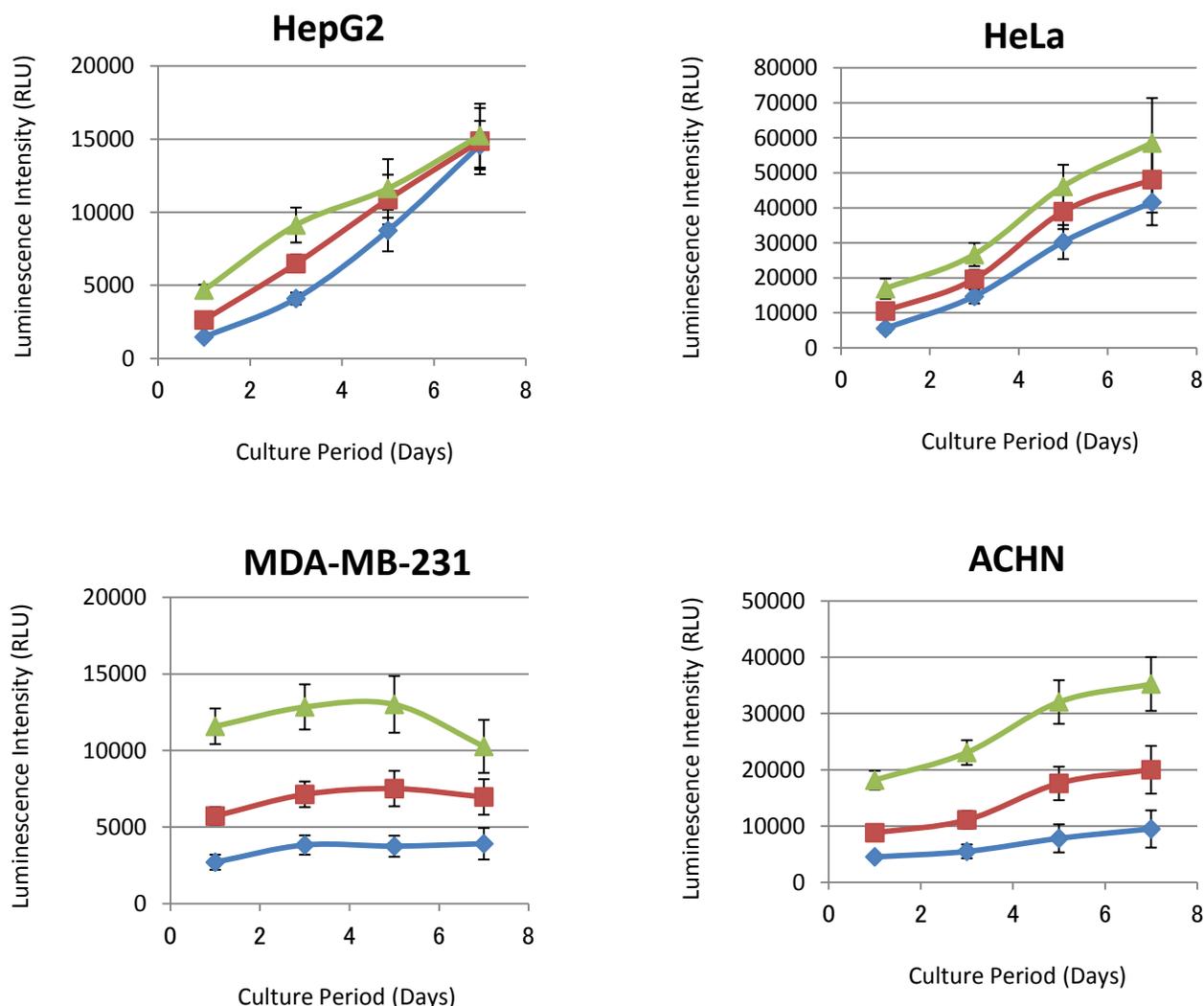


Fig. 1 各種細胞の増殖曲線 (◆:250cells/well, ■:500cells/well, ▲:1000cells/well)
HepG2, HeLa, およびACHN細胞についてはどの播種数においても経時的にATP量が大きくなった。一方, MDA-MB-231細胞は経時的にほとんど変化がなかった。

(注) 上記の数値は代表値であり保証値ではありません。

【Z'-Factorの算出】

＜手順＞

- ① 【細胞増殖曲線】実験の場合と同様に4枚のプレート(1, 3, 5, 7日目)に250, 500, 1000cell/wellの3播種数で各プレートに播種した。培地量は, 96ウェル白色プレート(MS-9096W)の場合 100μ L/well, 384ウェル白色プレート(MS-9384W)の場合 25μ L/wellとした。両端の列は培地のみを96wellプレートには100μ L, 384wellプレートには25μ L入れ, 0% controlとした。
- ② 播種後, 5%CO₂インキュベーターで培養し, 5日目にATP量を測定した。ATP試薬は, 96wellプレートの場合は100μ L, 384wellプレートの場合は25μ Lずつ添加し, ピペッティングやshakeはせず, 10分間静置したのちPerkin Elmer製プレートリーダーFusion α -FPで発光量を測定した。
- ③ 培地のみwellを0% Control, 細胞の入っている wellを100%としてZ'-factorを算出した。

Table.1 各種細胞におけるZ'-Factorの値

		HepG2		HeLa		MDA-MB-231		ACHN	
plate	cells/well	全well	内側well	全well	内側well	全well	内側well	全well	内側well
96 well	250	0.52	0.65	0.65	0.63	0.47	0.53	0.46	0.47
	500	0.76	0.76	0.69	0.69	0.42	0.42	0.64	0.64
	1000	0.67	0.74	0.57	0.55	0.67	0.68	0.49	0.49
384 well	250	0.58	0.67	0.58	0.56	0.41	0.44	0.41	0.40
	500	0.51	0.54	0.59	0.59	0.55	0.60	0.46	0.45
	1000	0.50	0.49	0.52	0.51	0.62	0.70	0.67	0.67

注) 内側 well : 最外周を除く, 内側のwell

スフェロイド形成能の高いHepG2,HeLa細胞ではZ'-factorが0.5を超える結果となった。
またスフェロイド形成能の低いMDA-MB-231,ACHN細胞でも0.4以上を示す結果となった。

$$Z\text{-factor} = 1 - \frac{3(\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|}$$

σ_p : ポジティブサンプルのSD, σ_n : ネガティブサンプルのSD
 μ_p : ポジティブサンプルの平均値, μ_n : ネガティブサンプルの平均値

Z-Factor値:

1 > Z > 0.5: 良好なアッセイ, 0.5 > Z > 0: 許容可能なアッセイ, Z < 0: 利用不可能なアッセイ

(注) 上記の数値は代表値であり保証値ではありません。

【参考資料】

イメージスキャナーCell³ iMagerを用いたスフェロイドサイズの経時変化観察

<目的と背景>

一般的に抗がん剤の薬効試験は、ATPアッセイ、MTTアッセイなど検査試薬を用いて細胞バイアビリティやミトコンドリア活性を評価する手間・時間のかかる試験です。加えて、破壊試験であるため、同一細胞での経過測定を行うことができないという課題があります。

これらの課題を解決することを目的とした簡便で高速な抗がん剤薬効スクリーニング方法が開発されました。大日本スクリーン製造株式会社製イメージスキャナーCell³ iMagerでは、高解像度画像処理技術を用いて、PrimeSurface[®]で培養されたスフェロイドの増殖や形態の経時変化を検査試薬不使用で高速に計測・分析することができることが報告されています [参考文献]。

そこで、本項では、イメージスキャナーCell³ iMagerを用いたスフェロイドのサイズ変化観察についてご紹介致します。

[参考文献]

第36回日本分子生物学会年会(2013)ポスター発表(3P-1025)

高速細胞スキャナーを用いたスフェロイド培養による抗がん剤スクリーニング法の開発(水上民夫, 東郷有希 et. al.)

<手順>

250, 500, 1000cell/wellの3播種数でPrimeSurface[®] 96ウェルプレート(MS-9096U)および384ウェルプレート(MS-9384U)にHepG2, HeLa, MDA-MB-231およびACHN細胞を播種した。培地量は、96ウェルプレート(MS-9096U)の場合 100 μ L/well, 384ウェルプレート(MS-9384U)の場合 25 μ L/wellとした。

播種後, Day1~Day8まで毎日, 大日本スクリーン製造株式会社製イメージスキャナーCell³ iMagerでスフェロイドの形状を観察測定した。

[補足 大日本スクリーン製造株式会社製イメージスキャナーCell³ iMagerの特長]

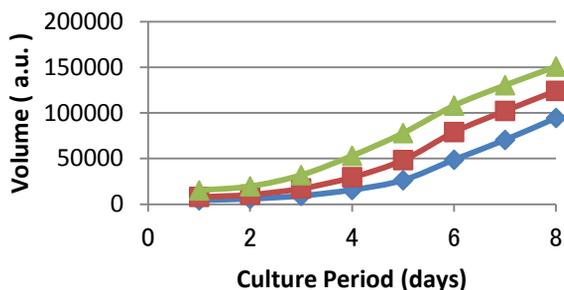
マルチウェルプレートを明視野でスキャンし、計測するシステムで、スフェロイドの疑似体積(*Pseudo Volume*)の推測値を算出することができます。

<結果>

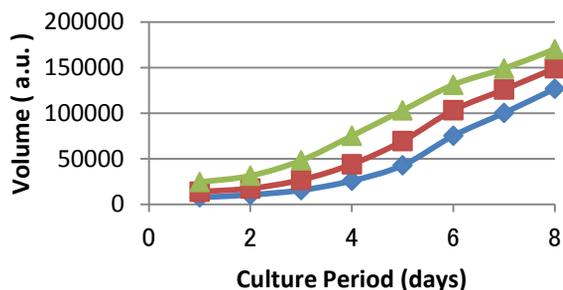
HepG2, HeLa, ACHN細胞はどの播種数においても経時的にスフェロイドが大きくなり、培養できた。一方、MDA-MB-231細胞はスフェロイド形成能の弱い細胞種であり、経時的に観察してもほとんど変化がなかった。

(注) 上記の数値は代表値であり保証値ではありません。

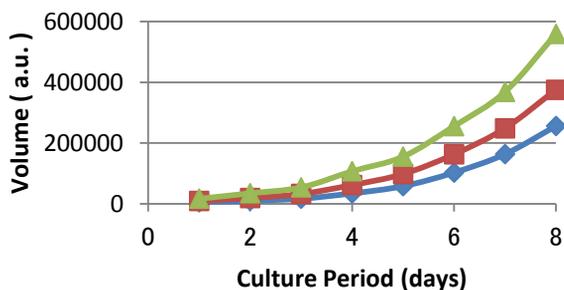
HepG2 (96well)



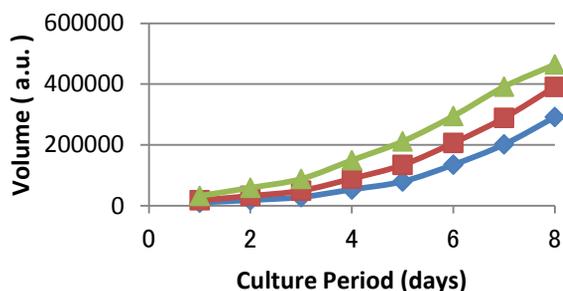
HepG2 (384well)



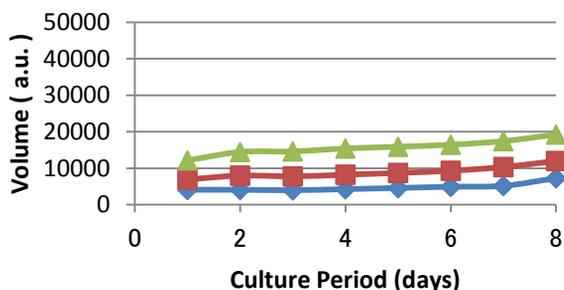
HeLa (96well)



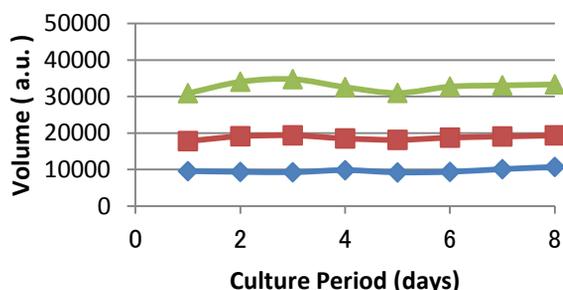
HeLa (384well)



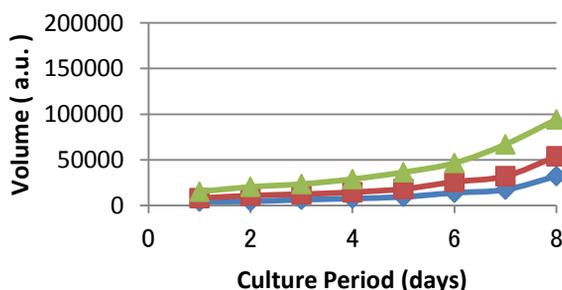
MDA-MB-231 (96well)



MDA-MB-231 (384well)



ACHN (96well)



ACHN (384well)

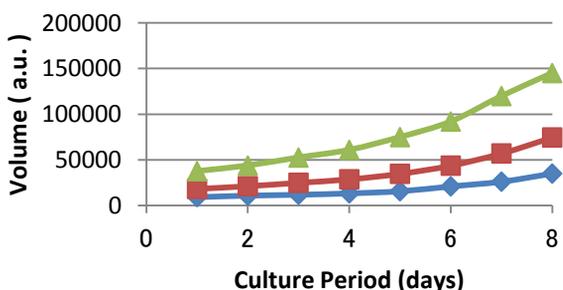


Fig. 2 各種細胞のスフェロイドサイズの経時変化
(◆ : 250cells/well, ■ : 500cells/well, ▲ : 1000cells/well)

(注) 上記の数値は代表値であり保証値ではありません。