

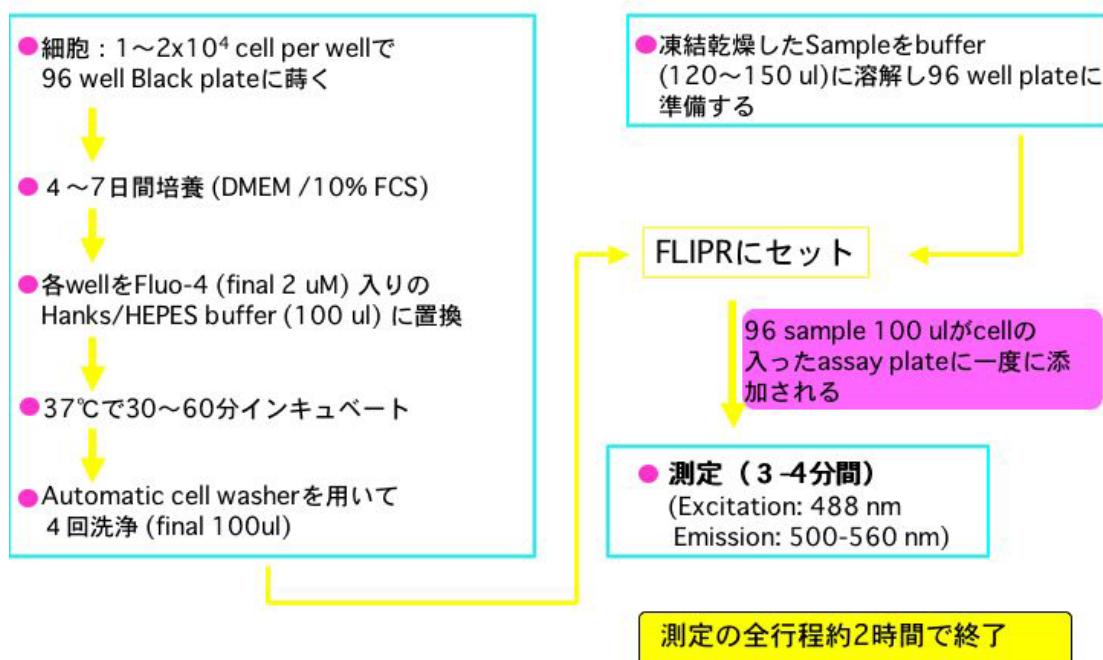
細胞内カルシウムイオン濃度上昇を指標とした生物活性測定法

原理

カルシウムイオン濃度の変動により蛍光変化を引き起こす Fluo-3、Fluo-4 などの試薬を細胞内に取り込ませ、96 穴プレート上でペプチド添加による蛍光の変動を FLIPR (Molecular Device 社) で観測する。ペプチドが細胞に作用した際、高い割合で細胞内器官、細胞外からカルシウムイオンが細胞質に流入し、細胞質のカルシウムイオン濃度が上昇することを利用する。

方法

FLIPR測定の手順



実例

ラット脳ペプチドをゲルろ過、イオン交換HPLCで分離し、更に逆相HPLCで分離した画分を下垂体前葉細胞、アストロサイトに投与したところ、2つの画分に細胞内カルシウムイオン濃度上昇活性が観測された。主要な活性画分を再度精製した結果、タキキニン系のニューロペプチド が同定された(図1左)。他の活性画分からはオレキシンBが精製された(図1右)。

図1. 細胞内カルシウム濃度を生物活性指標(FLIPR法)とするペプチド精製例

下垂体前葉細胞とアストロサイトを使用し、最終的にニューロペプチド とオレキシンBが精製された。

