

アルファスクリーンを用いた細胞内 cAMP 濃度の変動を指標とした生物活性測定法

原理

アルファスクリーンを用いた cAMP アッセイの原理は、2つの微細なビーズ(ドナービーズとアクセプタービーズ)が、ビオチン化 cAMP を介して近接することに基づく。レーザー照射によりドナービーズから化学的シグナルが発生し、このシグナルは、ドナービーズがアクセプタービーズに近接しなければ検出されない。ビオチン化 cAMP を介してこの2つのビーズが結合している場合は、化学反応カスケードが起こり、大きく増幅されたシグナル(蛍光)がアクセプタービーズから発生する。サンプル中に cAMP が存在する場合は、ビオチン化 cAMP による2つのビーズの結合に対して競合するため、蛍光強度が低下するので、この蛍光強度を測定することにより cAMP の定量が可能である。

方法

アルファスクリーンを用いたcAMP測定の方法

(サンプル調整)

- 前日 細胞を $3\sim 5 \times 10^4$ cell/well (P96)
- 細胞をPBSでwash後, HBSS/HEPES buffer (pH 7.4) 30 μ l
↓ 37°C 10 min
- control peptide または sample 30 μ l 添加
↓ 37°C 1 hr
- 5% Tween-20 5 μ l 添加
37°C 1 hr



(測定)

- サンプルまたはスタンダード 10 μ l を測定用プレートへ
↓ (以下、暗室)
- Anti-cAMP Acceptor beads mix 10 μ l 添加
↓ 室温 30 min
- SA-Donor beads/biotin-cAMP mix 30 μ l 添加
↓ 室温 1 hr または 4°C O/N
- 測定

実例

アルファスクリーンを用いた cAMP アッセイの standard curve は、中点約 230fmol であり(図1)、培養細胞(図は HEK293 細胞)の Folskolin による容量依存性の cAMP 産生を定量できる(図2)。また、Folskolin で刺激した ORL-1 発現 HEK293 細胞の cAMP 産生を Nociceptin により、10-11M から容量依存性に抑制した(図3)。

ラット脳強塩基性ペプチド画分のゲル濾過サンプルによる HEK293 細胞の cAMP 上昇活性を検索

した結果、分子量約 3000 ~ 4000 の分画に cAMP 上昇を認めた(図4)。活性を認める fraction45 ~ 48 を C-18 カラムを用いた逆相 HPLC で分離した結果、fr19, 20 の位置に cAMP 上昇活性を検出し、最終的には、VIP による活性であると考えられた(図5)。HEK293 細胞は内在性に VIP 受容体を有しており、脳抽出物中の VIP の活性を高感度に検出可能であった。

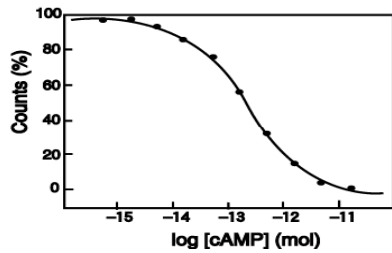


図1 . AlphaScreenを用いたcAMPアッセイの standard curve

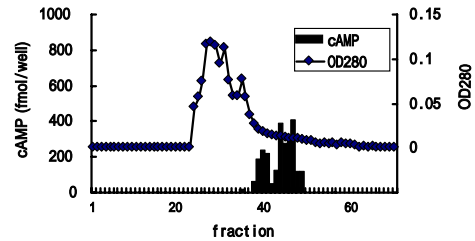


図4 . ラット脳強塩基性ペプチド画分のゲル濾過 サンプルのHEK293細胞におけるcAMP産生

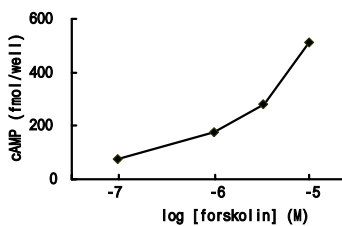


図2 . HEK293細胞のForskolinによるcAMP産生

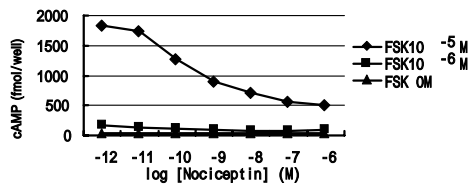


図3 . ORL-1を一過性に発現させたHEK293細胞 のNociceptinによるcAMP産生抑制

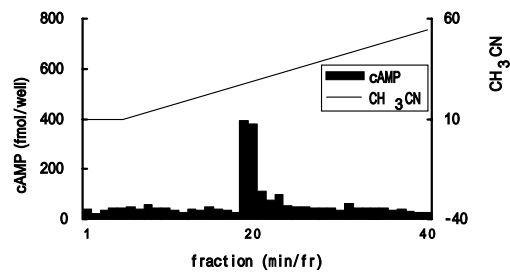


図5 . ゲル濾過fr45-48を逆相HPLCで分離 した際のHEK293細胞におけるcAMP産生