

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3601606号
(P3601606)

(45) 発行日 平成16年12月15日(2004.12.15)

(24) 登録日 平成16年10月1日(2004.10.1)

(51) Int.C1.⁷

F 1

C12Q 1/66
GO1N 21/78C12Q 1/66
GO1N 21/78

C

請求項の数 60 (全 37 頁)

(21) 出願番号 特願平9-502037
 (86) (22) 出願日 平成8年6月6日(1996.6.6)
 (65) 公表番号 特表平11-507534
 (43) 公表日 平成11年7月6日(1999.7.6)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1996/009833
 (87) 国際公開番号 WO1996/040988
 (87) 国際公開日 平成8年12月19日(1996.12.19)
 審査請求日 平成13年5月11日(2001.5.11)
 (31) 優先権主張番号 08/472,546
 (32) 優先日 平成7年6月7日(1995.6.7)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者
 プロメガ コーポレイション
 アメリカ合衆国、ウィスコンシン州 53
 711-5399, マディソン, ウッズ・
 ハロウ・ロード 2800番
 (74) 代理人
 弁理士 伊東 忠彦
 (72) 発明者
 シエルフ, ブルース エイ
 アメリカ合衆国、ウィスコンシン州 53
 597, ワウナキー, リヴァー・ロード
 6089番
 (72) 発明者
 ウッド, キース ヴィ
 アメリカ合衆国、ウィスコンシン州 53
 719, マディソン, コットケ・ドライヴ
 902番 5号

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】酵素媒介ルミネセンスのための試薬及び分析を抑制する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 少なくとも1つの酵素媒介ルミネセンス反応を開始する段階と；
 (b) その後、ルミネセンス反応によって発生したルミネセンスエネルギーを定量化する段階と；
 (c) その後、ルミネセンス反応に少なくとも1つの抑制試薬を導入することによって酵素媒介ルミネセンス反応からの光子放射を抑制する段階とからなる、酵素媒介ルミネセンス反応を分析する方法。

【請求項2】

該段階(a)において、少なくとも一つのルシフェラーゼ(luciferase)媒介ルミネセンス反応が開始される、請求項1記載の方法。 10

【請求項3】

該段階(c)において、ルシフェラーゼ媒介反応は、少なくとも1,000倍の係数で該ルシフェラーゼ媒介ルミネセンス反応から光子放射を減少するのに十分な量の抑制試薬を導入することにより抑制される、請求項2記載の方法。

【請求項4】

該段階(c)において、ルシフェラーゼ媒介反応は、
 ヨウ化物、
 ヨウ素、
 硫酸塩、

硝酸塩、
 イソ - プロパノール、
 2 - (4 - アミノフェニル) - 6 - メチルベンゾチアゾール、
 ジメチルデシルフォスフィン オキサイド、
 ピロリン酸塩、
 ベンゾチアゾール、
 2 - フェニルベンゾチアゾール、
 n - ブタノール、
 トランス - 1,2, - ジアミノシクロヘキサン - N,N,N',N' - テトラアセティック アシッド、
 10
 2 - (6' - ヒドロキシ - 2' - ベンゾチアゾリル) - チアゾール - 4 - カルボキシリック
 アシッド、
 エチレンジアミンテトラアセティック アシッド、
 2 (o - ヒドロキシフェニル) ベンゾチアゾール、
 万年筆インディアインク、
 ホウ水素化物還元され、過ヨウ素酸酸化された、アデノシン 5' - トリホスフェート 2'
 ,3' - アサイクリック ジアルコール、
 ドデシル硫酸ナトリウム、
 クエン酸、
 Tween · 20、
 20
 Triton · X - 100、
 及びそれらの混合物
 からなる群より選択された一若しくはそれ以上の抑制試薬で抑制される、請求項 3 記載の
 方法。
【請求項 5】
 該段階 (c) において、ルシフェラーゼ媒介反応は、
 SDS 及び Na I;
 I2 及び Na I;
 Na4PPI 及び Na I;
 Na4PPI, CDTA, 及び APMBT;
 30
 Na4PPI, APMBT, 及び Na2S04;
 Na4PPI, CDTA, APMBT, 及び Na2S04;
 Na4PPI 及び APMBT;
 Na4PPI 及び イソプロパノール;
 IFP インク 及び APMBT;
 APMBT 及び CDTA;
 IFP インク 及び CDTA;
 IFP インク 及び Na4PPI;
 SDS 及び Na I;
 Tween · 20 及び Na I;
 40
 Tween · 20, Na I, 及び n - ブタノール;
 Triton · X - 100 及び Na I;
 及びそれらの混合物
 からなる群より選択された抑制試薬からなる少なくとも 1 つの合成物で抑制される、請求
 項 3 記載の方法。
【請求項 6】
 該段階 (c) において、ルシフェラーゼ媒介反応からの光子放射は 10 秒より大きくない時
 間の期間内で少なくとも 1000 - 倍の係数で減少される、請求項 3 記載の方法。
【請求項 7】
 該段階 (a) において、甲虫ルシフェラーゼ及びそれらの機能的な同等物からなる群より
 50

選択されたルシフェラーゼにより媒介されるルシフェラーゼ媒介ルミネセンス反応が開始される、請求項 2 記載の方法。

【請求項 8】

該段階 (a) において、フォチヌス ピラリス (*Photius pyralis*) (北アメリカホタル) ルシフェラーゼ又はその機能的な同等物により媒介されるルシフェラーゼ媒介ルミネセンス反応が開始される、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

該段階 (c) において、フォチヌス ピラリス ルシフェラーゼ媒介反応は、
ヨウ化物、

ヨウ素、

10

硫酸塩、

硝酸塩、

イソ - プロパノール、

2 - (4 - アミノフェニル) - 6 - メチルベンゾチアゾール、

ジメチルデシルフォスフィン オキサイド、

ピロリン酸塩、

ベンゾチアゾール、

2 - フェニルベンゾチアゾール、

ドデシル硫酸ナトリウム、

トランス - 1,2, - ジアミノシクロヘキサン - N,N,N',N' - テトラアセティック アシッド、

2 - (6' - ヒドロキシ - 2' - ベンゾチアゾリル) - チアゾール - 4 - カルボキシリック
アシッド、

エチレンジアミンテトラアセティック アシッド、

2 (o - ヒドロキシフェニル) ベンゾチアゾール、

万年筆インディアインク、

ホウ水素化物還元され、過ヨウ素酸酸化された、アデノシン 5' - トリホスフェート 2',
3' - アサイクリック ジアルコール、

及びそれらの混合物

からなる群より選択された一若しくはそれ以上の抑制試薬で抑制される、請求項 3 記載の
方法。

【請求項 10】

該段階 (c) において、フォチヌス ピラリス ルシフェラーゼ媒介反応は、少なくとも
1,000 - 倍の係数で抑制される、請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

該段階 (c) において、フォチヌス ピラリス ルシフェラーゼ媒介反応は、
I₂及びNa I;

Na₄PPi及びNa I;

Na₄PPi, CDTA, 及びAPMBT;

Na₄PPi, APMBT, 及びNa₂SO₄;

40

Na₄PPi, CDTA, APMBT, 及びNa₂SO₄;

Na₄PPi及びAPMBT;

Na₄PPi及びイソプロパノール;

IFPインク及びAPMBT;

APMBT及びCDTA;

IFPインク及びCDTA;

IFPインク及びEDTA;

IFPインク及びNa₄PPi;

及びそれらの混合物

からなる群より選択された抑制試薬からなる少なくとも 1 つの合成物で抑制される、請求

50

項8記載の方法。

【請求項12】

該段階(c)において、フォチヌス ピラリス ルシフェラーゼ媒介反応は、Na4PPI及びNa I;並びにNa4PPI, CDTA, APMBT, 及びNa2S04からなる群より選択された抑制試薬からなる少なくとも1つの合成物で抑制される、請求項11記載の方法。

【請求項13】

該段階(c)において、フォチヌス ピラリス ルシフェラーゼ媒介反応は、少なくとも1,000-倍の係数で抑制される、請求項11記載の方法。

【請求項14】

該段階(a)において、ピロフォラス プラジオフタラムス (Pyrophorus plagiophthalamus) (ジャマイカ コメツキム シ) ルシフェラーゼより媒介されるルシフェラーゼ媒介ルミネセンス反応が開始される、請求項7記載の方法。 10

【請求項15】

該段階(c)において、ピロフォラス プラジオフタラムス ルシフェラーゼ媒介反応は

、

ヨウ化物、

ヨウ素、

硫酸塩、

硝酸塩、

イソ-プロパノール、 20

2-(4-アミノフェニル)-6-メチルベンゾチアゾール、

ジメチルデシルフォスフィン オキサイド、

ピロリン酸塩、

ベンゾチアゾール、

2-フェニルベンゾチアゾール、

トランス-1,2,-ジアミノシクロヘキサン- N,N,N',N' -テトラアセティック アシッド、

2-(6'-ヒドロキシ-2'-ベンゾチアゾリル)-チアゾール-4-カルボキシリック アシッド、

エチレンジアミンテトラアセティック アシッド、 30

エチレンジアミンテトラアセティック アシッド、

2(0-ヒドロキシフェニル)ベンゾチアゾール、

万年筆インディアインク、

ホウ水素化物還元され、過ヨウ素酸酸化された、アデノシン 5'-トリホスフェート 2',3'-アサイクリック ジアルコール、

アデノシン トリフォスフェート、

及びそれらの混合物

からなる群より選択された一若しくはそれ以上の抑制試薬で抑制される、請求項14記載の方法。

【請求項16】

該段階(c)において、ピロフォラス プラジオフタラムス ルシフェラーゼ媒介反応は、少なくとも1,000-倍の係数で抑制される、請求項15記載の方法。 40

【請求項17】

該段階(c)において、ピロフォラス プラジオフタラムス ルシフェラーゼ媒介反応は

、

I₂及びNa I;

Na4PPI及びNa I;

Na4PPI, CDTA, 及びAPMBT;

Na4PPI, APMBT, 及びNa2S04;

Na4PPI, CDTA, APMBT, 及びNa2S04; 50

Na4PPI及びAPMBT;
Na4PPI及びイソプロパノール;
IFPインク及びAPMBT;
APMBT及びCDTA;
IFPインク及びCDTA;
IFPインク及びEDTA;
インク及びNa4PPI;
及びそれらの混合物

からなる群より選択された抑制試薬からなる少なくとも1つの合成物で抑制される、請求項14記載の方法。

10

【請求項18】

該段階(c)において、ピロフォラス プラジオフタラムス ルシフェラーゼ媒介反応は、少なくとも1,000-倍の係数で抑制される、請求項17記載の方法。

【請求項19】

該段階(a)において、アントゾアン(anthozoan)ルシフェラーゼ及びそれらの機能的な同等物からなる群より選択されたルシフェラーゼにより媒介されるルシフェラーゼ媒介ルミネセンス反応が開始される、請求項2記載の方法。

【請求項20】

該段階(a)において、レニラ レニフォルミス(Renilla reniformis)(ウミシイタケ)により媒介されるルシフェラーゼ媒介ルミネセンス反応が開始される、請求項19記載の方法。

20

【請求項21】

該段階(c)において、レニラ レニフォルミス ルシフェラーゼ媒介反応は、

ヨウ化物、

ヨウ素、

ドデシル硫酸ナトリウム、

クエン酸、

Tween・20、

Triton・X-100、

n-ブタノール、

及びそれらの混合物

30

からなる群より選択された一若しくはそれ以上の抑制試薬で抑制される、請求項20記載の方法。

【請求項22】

該段階(c)において、レニラ レニフォルミス ルシフェラーゼ媒介反応は、少なくとも1,000-倍の係数で抑制される、請求項21記載の方法。

【請求項23】

該段階(c)において、レニラ レニフォルミス ルシフェラーゼ媒介反応は、

SDS、

SDS及びNa I;

I₂及びNa I;

Tween・20及びNa I;

Tween・20,Na I,及びn-ブタノール;

Triton・X-100及びNa I;

及びそれらの混合物

からなる群より選択された抑制試薬からなる少なくとも1つの合成物で抑制される、請求項20記載の方法。

40

【請求項24】

該段階(c)において、レニラ レニフォルミス ルシフェラーゼ媒介反応は、SDS;並びにSDS及びNa Iからなる合成物で抑制される、請求項23記載の方法。

50

【請求項 25】

該段階 (c) において、レニラ レニフォルミス ルシフェラーゼ媒介反応は、少なくとも1,000 - 倍の係数で抑制される、請求項23記載の方法。

【請求項 26】

該段階 (a) において、第一の酵素により媒介された第一の酵素媒介ルミネセンス反応が開始され、

第一の酵素媒介ルミネセンス反応を選択的に抑制し、同時に第一の酵素媒介ルミネセンス反応と異なる第二の酵素媒介ルミネセンス反応を開始することの可能な、抑制と活性化をする合成物を導入し、第二の酵素媒介ルミネセンス反応は該抑制と活性化をする合成物の導入により抑制されない、段階 (c) と；

(d) その後、第二の酵素媒介ルミネセンス反応によって発生したルミネセンスエネルギーを定量化する段階とから更になる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 27】

該段階 (a) において、第一のルシフェラーゼにより媒介された第一のルシフェラーゼ媒介ルミネセンス反応が開始される、請求項26記載の方法。

【請求項 28】

該段階 (a) において、第一のルシフェラーゼにより媒介された第一のルシフェラーゼ媒介ルミネセンス反応が開始され、

該段階 (c) において、第二の別個のルシフェラーゼにより媒介された、第二の別個のルシフェラーゼ媒介ルミネセンス反応が開始される、請求項27記載の方法。

【請求項 29】

該段階 (c) において、抑制と活性化をする合成物は少なくとも1,000 - 倍の係数で第一のルシフェラーゼ媒介ルミネセンス反応から光子反射を減少することができる、請求項28記載の方法。

【請求項 30】

該段階 (a) において、甲虫ルシフェラーゼ及びそれらの機能的な同等物からなる群から選択されたルシフェラーゼにより媒介される第一のルシフェラーゼ媒介ルミネセンス反応が開始され、

該段階 (c) において、アントゾアン ルシフェラーゼ及びそれらの機能的な同等物からなる群より選択されたルシフェラーゼにより媒介される第二のルシフェラーゼ媒介ルミネセンス反応が開始される、請求項28記載の方法。

【請求項 31】

該段階 (c) において、

ヨウ化物、

ヨウ素、

硫酸塩、

硝酸塩、

イソ - プロパノール、

2 - (4 - アミノフェニル) - 6 - メチルベンゾチアゾール、

ジメチルデシルフォスフィン オキサイド、

ピロリン酸塩、

ベンゾチアゾール、

2 - フェニルベンゾチアゾール、

トランス - 1,2, - ジアミノシクロヘキサン - N,N,N',N' - テトラアセティック アシッド、

2 - (6' - ヒドロキシ - 2' - ベンゾチアゾリル) - チアゾール - 4 - カルボキシリック アシッド、

エチレンジアミンテトラアセティック アシッド、

2 (0 - ヒドロキシフェニル) ベンゾチアゾール、

万年筆インディアインク、

10

20

30

40

50

ホウ水素化物還元され、過ヨウ素酸酸化された、アデノシン 5' - トリホスフェート 2',3' - アサイクリック ジアルコール、

ドデシル硫酸ナトリウム、

Tween・20、

Triton・X・100、

及びそれらの混合物

からなる群より選択された一若しくはそれ以上の抑制試薬と；

腔腸動物ルシフェリン及びそれらの機能的な同等物、及びその混合物からなる群より選択された一若しくはそれ以上の開始試薬と

からなる抑制と活性化をする合成物により、第一のルシフェラーゼ媒介ルミネセンス反応 10
が抑制され、第二のルシフェラーゼ媒介ルミネセンス反応が開始される、請求項30記載の
方法。

【請求項 3 2】

該段階 (c) において、第一のルシフェラーゼ媒介反応は、少なくとも1,000 - 倍の係数
で第一のルシフェラーゼ媒介ルミネセンス反応から光子放射を減少することができる抑制
と活性化をする合成物で抑制される、請求項31記載の方法。

【請求項 3 3】

該段階 (a) において、第一のフォチヌス ピラリス ルシフェラーゼにより媒介される
第一の酵素媒介ルミネセンス反応が開始される、請求項26記載の方法。

【請求項 3 4】

該段階 (c) において、第二のフォチヌス ピラリス ルシフェラーゼにより媒介される
第二の酵素媒介ルミネセンス反応が開始される、請求項26記載の方法。

【請求項 3 5】

該段階 (a) において、第一のレニラ レニフォルミス ルシフェラーゼにより媒介され
る第一の酵素媒介ルミネセンス反応が開始される、請求項26記載の方法。

【請求項 3 6】

該段階 (c) において、第二のレニラ レニフォルミス ルシフェラーゼにより媒介され
る第二の酵素媒介ルミネセンス反応が開始される、請求項26記載の方法。

【請求項 3 7】

該段階 (a) において、第一のピロフォラス プラジオフタラムス ルシフェラーゼによ
り媒介される第一の酵素媒介ルミネセンス反応が開始される、請求項26記載の方法。

【請求項 3 8】

該段階 (c) において、第二のピロフォラス プラジオフタラムス ルシフェラーゼによ
り媒介される第二の酵素媒介ルミネセンス反応が開始される、請求項26記載の方法。

【請求項 3 9】

該段階 (a) において、第一のフォチヌス ピラリス ルシフェラーゼにより媒介され
る第一の酵素媒介ルミネセンス反応が開始され、

該段階 (c) において、第二のレニラ レニフォルミス ルシ フェラーゼにより媒介さ
れる第二の酵素媒介ルミネセンス反応が開始される、請求項26記載の方法。

【請求項 4 0】

該段階 (c) において、

ヨウ化物、

ヨウ素、

硫酸塩、

硝酸塩、

イソ - プロパノール、

2 - (4 - アミノフェニル) - 6 - メチルベンゾチアゾール、

ジメチルデシルフォスフィン オキサイド、

ピロリン酸塩、

ベンゾチアゾール、

10

20

40

50

2 - フェニルベンゾチアゾール、
トランス - 1,2, - ジアミノシクロヘキサン - N,N,N',N' - テトラアセティック アシッド、

2 - (6' - ヒドロキシ - 2' - ベンゾチアゾリル) - チアゾール - 4 - カルボキシリック アシッド、

エチレンジアミンテトラアセティック アシッド、

2 (o - ヒドロキシフェニル) ベンゾチアゾール、

万年筆インディアインク、

ホウ水素化物還元され、過ヨウ素酸酸化された、アデノシン 5' - トリホスフェート 2', 3' - アサイクリック ジアルコール、

及びそれらの混合物

からなる群より選択された一若しくはそれ以上の抑制試薬と；

腔腸動物ルシフェリン、それらの機能的な同等物、及びその混合物からなる群より選択された開始試薬よりなる一の開始試薬とからなる抑制と活性化をする合成物により、第一のフォチヌス ピラリス ルシフェラーゼ媒介反応が抑制され、第二のレニラ レニフォルミス ルシフェラーゼ媒介反応が開始される、請求項39記載の方法。

【請求項 4 1】

該段階 (c) において、

Na4PPI, 及びコエレンテラジン (coelenterazine) ;

Na4PPI, Na I, 及びコエレンテラジン ;

Na4PPI, CDTA, 及びコエレンテラジン ;

Na4PPI, CDTA, APMBT, 及びコエレンテラジン ;

Na4PPI, APMBT, Na2S04, 及びコエレンテラジン ;

Na4PPI, CDTA, APMBT, Na2S04, 及びコエレンテラジン ;

Na4PPI, APMBT, 及びコエレンテラジン ;

APMBT, CDTA, 及びコエレンテラジン ;

及びそれらの混合物

からなる群より選択された混合物からなる抑制と活性化をする合成物により、第一のフォチヌス ピラリス ルシフェラーゼ媒介反応が抑制され、第二のレニラ レニフォルミス ルシフェラーゼ媒介反応が開始される、請求項39記載の方法。

【請求項 4 2】

該段階 (c) において、Na4PPI, APMBT, Na2S04, 及びコエレンテラジン；並びにNa4PPI, CDTA, APMBT, Na2S04, 及びコエレンテラジン、からなる群より選択された混合物からなる抑制と活性化をする合成物により、第一のフォチヌス ピラリス ルシフェラーゼ媒介反応が抑制され、第二のレニラ レニフォルミス ルシフェラーゼ媒介反応が開始される、請求項41記載の方法。

【請求項 4 3】

該段階 (a) において、第一のピロフォラス プラジオフタラムス ルシフェラーゼにより媒介される第一の酵素媒介ルミネセンス反応が開始され、

該段階 (c) において、第二のレニラ レニフォルミス ルシフェラーゼにより媒介される第二の酵素媒介ルミネセンス反応が開始される、請求項26記載の方法。

【請求項 4 4】

該段階 (a) において、第一のレニラ レニフォルミス ルシフェラーゼにより媒介される第一の酵素媒介ルミネセンス反応が開始され、

該段階 (c) において、第二のフォチヌス ピラリス ルシフェラーゼにより媒介される第二の酵素媒介ルミネセンス反応が開始される、請求項26記載の方法。

【請求項 4 5】

以下の：

(e) 第二の酵素媒介ルミネセンス反応によって発生したルミネセンスエネルギーを定量化した後に、少なくとも 1 つの第二の抑制試薬を第二の酵素媒介ルミネセンス反応に導入

することにより第二の酵素媒介ルミネセンス反応を抑制する段階から更になり、該少なくとも1つの第二の抑制試薬は少なくとも1,000-倍の係数で第二の酵素媒介ルミネセンス反応からの光子放射を減少させることができる、請求項26記載の方法。

【請求項46】

(a) 少なくとも1つの酵素媒介ルミネセンス反応を開始する段階と；
 (b) その後、ルミネセンス反応によって発生したルミネセンスエネルギーを定量化する段階と；
 (c) その後、ルミネセンス反応に少なくとも1つの抑制試薬を導入することによって酵素媒介ルミネセンス反応を抑制する段階とからなり、
 多試料分析プレート内で試料間の光の屈折干渉が除去される、多試料分析プレート内で酵素媒介ルミネセンス反応を分析する方法。 10

【請求項47】

該段階(a)において、少なくとも一つのルシフェラーゼ媒介ルミネセンス反応が開始される、請求項46記載の方法。

【請求項48】

少なくとも1,000-倍の係数で酵素媒介ルミネセンス反応からの光子放射を減少させることができる少なくとも1つの抑制試薬合成功物と；
 該少なくとも1つの抑制試薬合成功物を中に配置する適当な第一の容器と；
 分析される酵素媒介ルミネセンス反応に対応する少なくとも1つの機能的な酵素基質と；
 該少なくとも1つの機能的な酵素基質を中に配置する適当な第二の容器と； 20
 使用のための概説書とからなる、前記請求項の何れか一つの方法を実施する使用のための酵素媒介ルミネセンス反応の分析キット。

【請求項49】

前記の分析される酵素媒介ルミネセンス反応に対応する少なくとも1つの機能的な酵素基質は機能的なルシフェラーゼ基質である、請求項48記載のキット。

【請求項50】

該少なくとも1つの抑制試薬合成功物は、

ヨウ化物、

ヨウ素、

硫酸塩、

硝酸塩、 30

イソ-プロパノール、

2-(4-アミノフェニル)-6-メチルベンゾチアゾール、

ジメチルデシルフォスフィン オキサイド、

ピロリン酸塩、

ベンゾチアゾール、

2-フェニルベンゾチアゾール、

n-ブタノール、

トランス-1,2,-ジアミノシクロヘキサン- N,N,N',N' -テトラアセティック アシッド、 40

2-(6'-ヒドロキシ-2'-ベンゾチアゾリル)-チアゾール-4-カルボキシリック アシッド、

エチレンジアミンテトラアセティック アシッド、

2(0-ヒドロキシフェニル)ベンゾチアゾール、

万年筆インディアインク、

ホウ水素化物還元され、過ヨウ素酸酸化された、アデノシン 5'-トリホスフェート 2',3'-アサイクリック ジアルコール、

ドデシル硫酸ナトリウム、

クエン酸、

Tween・20、 50

Triton・X - 100、

及びそれらの混合物

からなる群より選択された抑制試薬からなる、請求項49記載のキット。

【請求項 5 1】

該少なくとも 1 つの抑制試薬合成物は、

Na4PPI 及び Na I;

Na4PPI, CDTA, 及び APMBT;

Na4PPI, APMBT, 及び Na2SO4;

Na4PPI, CDTA, APMBT, 及び Na2SO4;

Na4PPI 及び APMBT;

Na4PPI 及びイソプロパノール;

APMBT 及び CDTA;

Na I 及び I2;

SDS 及び Na I;

Tween・20 及び Na I;

Tween・20, Na I, 及び n - ブタノール;

Triton・X - 100 及び Na I;

及びそれらの混合物

からなる群より選択された少なくとも 1 つの混合物である、請求項50記載のキット。

【請求項 5 2】

分析される第一の酵素媒介ルミネセンス反応に対応する第一の機能的な酵素基質と;

該第一の機能的な酵素基質を中に配置する適当な第一の容器と;

少なくとも 1,000 - 倍の係数で第一の酵素媒介ルミネセンス反応からの光子放射を抑制することができる抑制試薬と、該抑制試薬によって抑制されない第二の別個の酵素媒介ルミネセンス反応に対応する第二の別個の機能的な酵素基質とからなる抑制と活性化をする合成物と;

該抑制と活性化をする合成物を中に配置する適当な第二の容器と;

使用のための概説書とからなる、複レポータの酵素媒介ルミネセンス反応分析キット。

【請求項 5 3】

該第一の機能的な酵素基質、及び該第二の別個の機能的な酵素基質はルシフェラーゼ基質である、請求項52記載のキット。

【請求項 5 4】

該抑制と活性化をする合成物は、

ヨウ化物、

ヨウ素、

硫酸塩、

硝酸塩、

イソ - プロパノール、

2 - (4 - アミノフェニル) - 6 - メチルベンゾチアゾール、

ジメチルデシルフォスフィン オキサイド、

ピロリン酸塩、

n - ブタノール

ベンゾチアゾール、

2 - フェニルベンゾチアゾール、

トランス - 1,2, - ジアミノシクロヘキサン - N,N,N',N' - テトラアセティック アシッド、

2 - (6' - ヒドロキシ - 2' - ベンゾチアゾリル) - チアゾール - 4 - カルボキシリック アシッド、

エチレンジアミンテトラアセティック アシッド、

2 (o - ヒドロキシフェニル) ベンゾチアゾール、

10

20

30

40

50

万年筆インディアインク、

ホウ水素化物還元され、過ヨウ素酸酸化された、アデノシン 5' - トリホスフェート 2',3' - アサイクリック ジアルコール、

ドデシル硫酸ナトリウム、

クエン酸、

Tween・20、

Triton・X・100、

及びそれらの混合物

からなる群より選択された一若しくはそれ以上の抑制試薬と、

腔腸動物ルシフェリン及びそれらの機能的な同等物、甲虫ルシフェリン及びそれらの機能的な同等物、並びにそれらの混合物からなる群から選択された第二の別個の機能的な酵素基質はルシフェラーゼ基質と

からなる、請求項53記載のキット。

【請求項 5 5】

該抑制と活性化をする合成物は、

Na4PPI, 及びコエレンテラジン；

Na4PPI, Na I, 及びコエレンテラジン；

Na4PPI, CDTA, 及びコエレンテラジン；

Na4PPI, CDTA, APMBT, 及びコエレンテラジン；

Na4PPI, APMBT, Na2S04, 及びコエレンテラジン；

Na4PPI, CDTA, APMBT, Na2S04, 及びコエレンテラジン；

Na4PPI, APMBT, 及びコエレンテラジン；

APMBT, CDTA, 及びコエレンテラジン；

及びそれらの混合物

からなる群より選択された混合物からなる、請求項54記載のキット。

【請求項 5 6】

第二の別個の酵素媒介反応からの光子放射を抑制することができる第二の抑制試薬と、

該第二の抑制試薬を中に配置する適当な第三の容器と；

から更になる、請求項52記載のキット。

【請求項 5 7】

ヨウ化物、

ヨウ素、

硫酸塩、

硝酸塩、

イソ - プロパノール、

2 - (4 - アミノフェニル) - 6 - メチルベンゾチアゾール、

ジメチルデシルフォスフィン オキサイド、

ピロリン酸塩、

ベンゾチアゾール、

2 - フェニルベンゾチアゾール、

n - ブタノール、

トランス - 1,2, - ジアミノシクロヘキサン - N,N,N',N' - テトラアセティック アシッド、

2 - (6' - ヒドロキシ - 2' - ベンゾチアゾリル) - チアゾール - 4 - カルボキシリック アシッド、

エチレンジアミンテトラアセティック アシッド、

2 (o - ヒドロキシフェニル) ベンゾチアゾール、

万年筆インディアインク、

ホウ水素化物還元され、過ヨウ素酸酸化された、アデノシン 5' - トリホスフェート 2',3' - アサイクリック ジアルコール、

10

20

30

40

50

ドデシル硫酸ナトリウム、
クエン酸、
Tween・20、
Triton・X-100、
及びそれらの混合物

からなる、酵素媒介ルミネセンス反応からの光子放射を減少させることができる、請求項1-47の何れか一の方法において抑制試薬として使用するための試薬。

【請求項58】

分析に適する溶媒中に含有された、

SDS及びNa I;
I2及びNa I;
Na4PPI及びNa I;
Na4PPI, CDTA, 及びAPMBT;
Na4PPI, APMBT, 及びNa2S04;
Na4PPI, CDTA, APMBT, 及びNa2S04;
Na4PPI及びAPMBT;
Na4PPI及びイソプロパノール;
IFPインク及びAPMBT;
APMBT及びCDTA;
IFPインク及びCDTA;
IFPインク及びNa4PPI;
SDS及びNa I;
Tween・20及びNa I;
Tween・20, Na I, 及びn-ブタノール;
Triton・X-100及びNa I;

及びそれらの混合物

からなる群より選択された混合物：

からなる、請求項57記載の酵素媒介ルミネセンス反応の抑制試薬。

【請求項59】

SDS及びNa I; Na4PPI及びNa I; 並びにNa4PPI, CDTA, APMBT, 及びNa2S04; からなる群から選択された、請求項58記載の酵素媒介ルミネセンス反応の抑制試薬。 30

【請求項60】

Na4PPI, APMBT, Na2S04, 及びコエレンテラジン； 並びにNa4PPI, CDTA, APMBT, Na2S04, 及びコエレンテラジン； からなる群から選択された、請求項58記載の酵素媒介ルミネセンス反応の抑制と活性化をする試薬。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は酵素媒体の単及び複レポータルミネセンス分析及びルミネセンス反応を抑制する試薬に関する。本発明は、特定的には少なくとも1つの酵素と、1つ以上のルミネセンス抑制試薬を使用するルミネセンス分析に関する。 40

引用された参考文献

本出願の中で引用された参考文献は、完全な図書目録の列記として請求の範囲の前のセクションに記載されている。

従来の技術の説明

ルミネセンスは、ルシフェラーゼ媒体酸化反応の結果として幾つかの生体の中で発生される。現在、非常に多くの異なる種からの様々なルシフェラーゼ遺伝子、特にPhotinus pyralis(北米の普通のホタル)、Pyrophorus plagiophthalmus(ジャマイカコメツキムシ)、Renilla reniformis(ウミシイタケ)、及び幾つかのバクテリア(例えばXenorhabdus luminescens及びVibrio spp)は非常によく使用されるルミネセンスレポータ遺伝子である。ルミネセンスレポータ遺伝子分析の考察についてはBrostein他(1994年)を参照の 50

こと。ホタルルシフェラーゼはまた、生物量を検出するために広く使用される、ATP濃度の一般的なレポータである。科学的な文献の中で様々な他のルシフェラーゼのレポータ応用が説明されてきた。ルミネセンスは、ある合成基質と混合される場合、他の酵素によって発生されえ；これは例えばアダマンチルジオキセタンと混合されたアルカリ性ホスフォターゼ又はルミノールと混合されたセイヨウワサビペルオキシダーゼである。

ルシフェラーゼ遺伝子は、その非放射性の性質、感度及びルミネセンス分析の極端に線形のレンジによって遺伝子レポータとして広く使用される。例えば、わずか 10^{-20} モルのホタルルシフェラーゼが検出されうる。従って、遺伝子活性のルシフェラーゼ分析は、原核細胞及び真核細胞の培養の両方と、導入遺伝子植物及び導入遺伝子動物と、セル-フリー発現システムとを含む実質的に全ての実験的な生物システムに使用される。同様にATPのルミネセンス分析は非常に高感度であり、 10^{-16} モル以下の検出が可能である。
10

ルシフェラーゼは、ルシフェリンと称される酵素に特異的な基質の酸化を通じて光を発生する。ホタルルシフェラーゼ及び他の全ての甲虫ルシフェラーゼでは、これはマグネシウムイオン、酵素及びATPの存在の下で行われる。レニラルシフェラーゼを含む花虫綱ルシフェラーゼでは、ルシフェリンと共に酸素のみが必要とされる。概して、遺伝子活性のルミネセンス分析では、反応基質及び他のルミネセンス活性化試薬は、レポータ酵素を発現する疑いのある生物システムの中に導入される。結果としてのルミネセンスは、存在するのであれば、ルミノメータ又は適当な放射エネルギー測定装置を使用して測定される。分析は高速且つ高感度であり、放射性試薬の必要なしに速く簡単に遺伝子発現データを提供する。遺伝子活性に対する分析以外のレポータ分析は同様に実行される。
20

ホタルルシフェラーゼを使用した遺伝子活性の従来の分析は、より大きな酵素代謝回転と、従ってより大きなルミネセンス強度を生じさせるため、分析試薬の中にコエンザイムA (CoA) を含むことによって更に改善されてきた。（米国ワイオミング州マジソンのPromega社のカタログ番号E1500番のPromegaルシフェラーゼ分析試薬；1994年2月1日発行の米国特許第5,283,179号参照。）この試薬を使用し、ルシフェラーゼ活性はルミノメータ又はシンチレーション計数管によって容易に測定されうる。安定した光放射を発生するようCoAの添加によって緩和されたルシフェラーゼ反応は、遺伝子的に変更された細胞又は組織の中でルシフェラーゼ発現を定量化するための非常に高感度且つ高速の分析を提供する。
。

大きな欠点は、しかしながら高スループットの適用ではルミネセンス分析の使用は、標準的な実験室装置と不一致となることである。例えば、光学的に透明なプレートを通過する光の内部屈折により、精度又は精密度を有する透明なマルチウェルプレートの中に含まれたルミネセンス反応を定量化することは可能ではない。図1は、従来の96ウェルの透明なポリスチレンマイクロタイプレートを使用する場合、1つのウェルの中で発生したルミネセンス信号は比較的長い距離に亘ってプラスチックを通って屈折されることを示す。従って、1つの発光試料から屈折された光は、続くウェルの中の発光試料からの信号の続く測定と干渉しうる。図2は、単一の透明なプラスチックプレートの中の多数の発光試料から発せられる屈折された光の累積的な性質を示す図である。第1の試料ウェルの中のルミネセンス信号が正確に測定されうる一方、続くウェルの中のルミネセンス反応の順次的な活性化は、全ての前の試料からのプラスチックを通って屈折された光子の累積的な放射により、非常に不正確な測定となる。この屈折された光の問題、又は「屈折クロストーク」は、明るく照明されたウェルがルミネセンスが発生されない負の制御ウェルに隣接して配置されたとき、又は明るく光るウェルが比較的暗いウェルの近くに配置されたときに悪化される。これは、透明なマルチウェルプレートの中の絶対及び基線ルミネセンスの決定を難しく、又は不可能にする。
30

白色又は黒色ポリエチレンといった不透明なプラスチックからなるマルチウェルプレートが（例えば米国バージニア州シャンティリーのDynaTech Laboratories；フィンランド国ヘルシンキのLabsystems；デンマーク国ロスキルデのNUNCより）市販されており、高スループットルミネセンス分析を含む応用の中で試料間の屈折クロストークを防ぐために現在採用されている（1994年のBlaise,C他参照）。しかしながら、白色のプラスチックの反射率
40

は透明なプレートよりも大きなルミネセンス感度を生ずる一方、光子は隣接するウェルの壁から容易に散乱され、再びウェルの間にクロストーク干渉をもたらす。ここで、クロストークは「反射クロストーク」と称される。屈折クロストークと同様に、反射クロストークは明るいウェルに隣接する（ルシフェラーゼを含まない負の制御といった）暗いウェルを分析するときに特に明らかである。元はルミネセンス応用のためであった黒色96ウェルプレートは、プラスチックの非反射性の性質によって試料信号が大きく減少されるため、ルミネセンス応用には理想的ではない。

色に拘わらず、不透明なプレートの増大された価格は従来の透明なプレートと比較して実質的であって使用できない程である。

これらの価格に加え、不透明なプレートは透明なマルチウェルプレートには関連されない技術的な制約を課す。例えば、多くの調査者は、細胞を最終的な分析を実行するために使用されるマイクロプレートのウェルの中で直接培養することによって、分析動作を促進し、材料の費用を減少させようと望む。不透明なプレートは以下の理由、即ち：

i) 培養された細胞は不透明なプレートを通して見る、又は撮影することができない、
ii) 不透明なプラスチックの構成及び表面特性は、規格細胞培養に適したプラスチックウェアの構成及び表面特性とは異なり、細胞接着及び成長特性に対する影響を決定していない、

iii) (別々に包装された) 殺菌された細胞培養に適した不透明プレート及びカバーは広く入手可能でないことにより、上記の目的のためには劣っている。

1つの製造元（米国コネチカット州メリディアンのPackard社）は不透明プレートに関する技術的な問題を認識し、（製造番号第600 - 5181番の「View Plate」なる名称で市販されている）透明なプラスチックの底を有する不透明なプラスチックの本体からなる特殊なプレートを開発することにより問題に応じた。しかしながら、そのような特殊なプレートの可能性は限定されており、学校及び私的研究室の両方の高スループットユーザにとって、そのような消費財の高い価格は概して使えない程高価である。

上述の論議から明らかであるように、既知のルシフェラーゼ分析の速度及び感度を維持しながらも、光学的に透明なプラスチックから製造される従来の細胞培養に適したマルチウェルプレートで実行されうるルミネセンス分析が実質的に必要とされている。

本発明はそのようなルミネセンス分析を提供する。本発明は、所与のルミネセンス反応を迅速に制御する少なくとも1つの試薬を含み、それによりウェル間の反射又は屈折クロストークなしに続くウェルが分析されることを可能にするルミネセンス分析に関する。Thompson他による1991年の出版物には、ホタルルシフェラーゼ中のコンフォーメーションの変化を引き起こすための基質アナログ（ベンゾチアゾール、フェニルベンゾチアゾール及びヒドロキシフェニルベンゾチアゾール）の使用についての報告が示されている。Thompsonは、ルシフェラーゼ酵素に結合されたとき、上記化合物はタンパク質分解減成に対するより大きな耐性を与えることによりルシフェラーゼ酵素に増加された生体内及び生体外の安定性を提供する。甲虫ルシフェリンのアナログはホタルルシフェラーゼ活性の禁止剤であるが、処理された試料からのルシフェラーゼ活性分析は様々な残留基質アナログの副禁止的濃度を含む希釀された細胞抽出物を使用して実行された。

1980年11月25日にA.T.Lundinに対して発行された米国特許第4,235,961号は、クレアチニンキナーゼのサブユニットBの測光法による決定の方法を説明する。分析は、ルシフェラーゼ/Dルシフェリン反応の拮抗阻害剤として作用する、天然甲虫ルシフェラーゼ基質（Dルシフェリン）のLルシフェリン鏡像体の存在の下で進行する。測光法による反応の禁止は試料からのより連続的な光の放射を提供し、それによりクレアチニンキナーゼ反応のキネティクスが調査されることを可能にする。

Berthold他に対して1983年6月28日に発行された米国特許第4,390,274号は、第1の実験的な測光法による測定が行われた後に、試料に対して追加的なルミネセンス基質が添加される測光法による分析を説明する。第2の測光法による測定が行われる。添加された基質は測定された実験的な基質とは化学的に異なるが、第1の測定で分光法によって決定されたルミネセンス反応システムと同じシステムの中の反応パートナーである。追加された基

10

20

30

40

50

質は夫々の試料の内部標準化のために使用される。

他の様々な文献がルシフェラーゼ反応のルミネセンスを減少させる化合物を説明しているが、それ自体が意味のある値の減少について説明するものではない。1970年のDenburg及びMcElroyによる出版物は、ホタルルシフェラーゼルミネセンス反応の禁止剤としての選択されたアニオンの相互作用についての調査を表している。チオシアノ酸塩、ヨウ化物、窒化物、臭化物及び塩化物は、ルシフェラーゼ酵素に対して様々な禁止的な相互作用を有することが調査されている。1970年のLee他による出版物及び1969年のDenburg他による出版物は、ホタルルシフェラーゼルミネセンス反応の様々な拮抗阻害剤の調査を表している。

複酵素レポータシステムの概念は、単一のシステムの中の2つの個々のレポータ酵素の同時使用、発現及び測定に関する。遺伝子レポーティングでは、現在複レポータ分析から良い影響を受けるものの例は、同時に2つの異なるレポータ遺伝子を発現するよう遺伝子的に操作された（培養の中に分散された細胞、分離された組織、動物全体といった）個々の細胞又は細胞群を含む。最も頻繁には、1つの遺伝子の活性は特異的な実験的条件の影響をレポートし、一方第2のレポータ遺伝子はそれによって全て実験的な値の組が正規化される内部制御を提供する。

複酵素レポータ技術から良い影響を受けうるセル-フリー再構成システムは、実験的レポータ酵素及び制御レポータ酵素をコード化する独立した遺伝子材料の同時翻訳、又は結合された転写及び翻訳のために得られた細胞溶解物である。免疫分析は同様に、単一の試料からの実験的な値及び制御値の両方のディアルレポーティングのために設計されうる。

現在、ホタルルシフェラーゼ(luc)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、ベータガラクトシダーゼ(lacZ)、ベータグルコシダーゼ(GUS)及び、分泌されたアルカリ性ホスファターゼ(SEAP)及びウテロフェリン(Uf;酸性ホスファターゼ)といった様々なホスファターゼが結合され、使用されている。以下の参考文献は遺伝子活性のディアルレポーティングのための結合された形式で使用される様々なレポータ遺伝子の例を示し、それらの文献は、luc及びGUS:1994年Leckie,F.他;Luc及びCAT、及びluc及びlacZ:1992年Jain,V.K.及びMagrath,I.T.;CAT及びlacZ:1991年Flanagan,W.M.他;SEAP及びUf:1994年Kondepudi他である。

複酵素レポータ分析の性能は、構成となる酵素の化学的性質の特徴と、それらの夫々の結果としてのデータセットを相關する能力によって制限されている。単一のセル溶解液の中から上述のレポータのいずれか2つの結合された発現を定量化することは、夫々のレポータの活性が別々に分析されうるよう試料を分割することを必要とする。従って、これらの様々なレポータ酵素の異なる酵素キネティックス、分析の化学的性質及び潜伏条件は、それらを統合された、単一の管の複レポータ分析形式に結合することを不可能にする。理想的な複レポータシステムは、両立しうる化学的性質と、全く同じ温度及び扱いの条件、速度、感度及び検出に必要とされる器具使用を有する2つの酵素分析からなる。

発明の要約

本発明は、一般的に、酵素媒介ルミネセンス反応を分析する方法、多試料分析プレートで酵素媒介ルミネセンス反応を分析する方法、酵素媒介ルミネセンス反応の分析キット、複レポータの酵素媒介ルミネセンス反応分析キット、及び酵素媒介ルミネセンス反応の抑制試薬に関する。また、本発明は、特に、酵素媒介ルミネセンス反応を迅速及び効率的に抑制するために1つ以上の試薬を使用する、単酵素及び統合された複酵素ルミネセンス分析に関する。

酵素媒介ルミネセンス反応とは、反応の結果として光子を発生し、反応を効率的に可能にするために酵素を使用する化学反応である。例として、*Photinus pyralis*のホタルルシフェラーゼ又は*Renilla reniformis*のレニラルシフェラーゼといった、様々な発光生体から分離されたルシフェラーゼが挙げられる。ルシフェラーゼは、ルミネセンス反応を触媒する発光生体の中で発見される酵素である。これらはそのルミネセンス反応の属性に基づいて群にまとめられる。群中の全てのルシフェラーゼは関連する発光生体から得られ、同じ化学反応を触媒する。例として、全てが甲虫ルシフェリンのATP媒体酸化を触媒する甲虫

10

20

30

40

50

ルシフェラーゼ及び全てがコエレンテラジンの酸化を触媒する花虫綱ルシフェラーゼ（1985年Ward）がある。分子生物学の技術的な能力では、機能的等価物を生じさせるために自然に発見されるルシフェラーゼの構造を変化させることが可能である。機能的等価物は、同じルミネセンス反応を触媒する能力を維持し、従って酵素の同じ群に維持される酵素である。例として、2機能ハイブリッド蛋白を生じさせるよう他の蛋白への遺伝子的融合がある（1993年Kobatake他）。ルシフェラーゼ以外の他の酵素は、合成基質を使用してルミネセンス反応を媒介しうる。例として、ルミノールを含む反応を触媒するセイヨウワサビペロキシダーゼ（1986年Thorp他）；と、アダマンチル1,2ジオキセタンとの反応を触媒するアルカリ性ホスファターゼ（1989年Schaap他）とがある。

ルミネセンスレポータはルミネセンス反応を媒介する分子であり、そうすることにより化学又は生化学システムの状態についての情報を生ずる。例として、遺伝子レポータ（1995年Wood）、免疫分析レポータ（1991年Bronstein他）及びATPレポータ（1991年Schram）がある。酵素は化学的変形を触媒するタンパクであり、従ってその変形によって変化されない。酵素は変形の最後において再生されないため、追加的な変形の周期が可能である；酵素は従って基質代謝回転のための能力を有する。この性質は、酵素媒介ルミネセンス反応の連続的なルミネセンスのための能力を可能にする。エクオリン（1985年Ward）といった幾つかのタンパクは、基質代謝回転を許さず、これは連続的なルミネセンスを支持しない。これらのタンパクは酵素ではなく、本発明の範囲を逸脱している。そのようなタンパクの脂質が基質代謝回転を許すよう変更されれば、これらは酵素となり、従って本発明に含まれる。酵素媒介ルミネセンス反応の中の酵素は、反応の中で発生されたルミネセンスの大部分が酵素の反応の結果として続くとき、効果的に反応を可能にするといえる。

第1の実施例では、本発明は特定的でなくルミネセンス酵素反応を消滅させる試薬を使用した単レポータルミネセンス分析に関する。以下一般的な酵素抑制と称される本発明のこの実施例では、ルミネセンス反応はまず正しい開始試薬を実験的システムの中に添加することによって開始される。実験的システムの中で発生されたルミネセンス信号は次に増倍型光電管、又は他の適当な手段を使用して測定される。酵素反応は次に一般的な抑制試薬を添加することによって抑制される。抑制試薬は、抑制試薬の導入の後の比較的短い時間の間にルミネセンス信号を1,000倍減少させねばならない。ルミネセンス信号は30秒以内に抑制されることが望ましく、約10秒以内に抑制されることが更に望ましい。これは多数の試料が非常に迅速に分析されることを可能にする。一般的な抑制試薬のための望ましい公式は、所与の酵素反応のルミネセンス信号を100,000倍減少させる。

試料の中からルミネセンス信号を消滅させることにより、一般的な抑制試薬の添加は、前に活性化された試料からの光がマルチサンプル分析形式で続いて活性化された試料の中の光の測定と干渉することを防ぐ。

一般的な抑制試薬の種類の例は、有機試薬（例えばイソプロパノール）、合成洗剤（例えばSDS）及び疎水性の染料といった構造的挿入物を含む。そのような一般的な抑制試薬は、自動注入器及び従来の96ウェルプレートといった（不透明及び透明の）マイクロタイタープレートにおける使用に理想的に適している。

抑制試薬は試料の中からのルミネセンス信号を効果的に消滅させるため、多重ルミネセンス分析は試料間の屈折クロストークなしに透明なマルチウェルプレートの中で実行される。

更に、大きな反射性のために白色プレートの中で低活性のルミネセンス分析を実行することを選択する調査者は、反射された背景光の受容できないレベルを除去するため、本発明によって利益を得る。

第2の実施例では、本発明は選択的に1つのレポータ酵素を消滅させる一方で同時に他の別の酵素媒介ルミネセンス反応を開始させる試薬を使用する複レポータルミネセンス分析に関する。ここでは、試薬は特定的に選択された酵素媒介ルミネセンス反応のみを抑制するため、抑制試薬は特定抑制試薬と称される。試薬が、第2の酵素媒介ルミネセンス反応の同時開始を可能にするよう更に調合されるとき、試薬は「抑制及び活性化」試薬と称される。この分析は、1つの使用の中の2つの分離した別のルミネセンスレポータの順次的

10

20

30

40

50

な測定を可能にする。結果として、ルミネセンスレポータのうちの1つは内部標準として使用され、一方他のレポータは実験的な変数の影響をレポートするために使用される。複レポータ分析では、2つの別の酵素レポータが使用される。2つの酵素は別々に様々な試薬に対応し、従っていずれかの酵素媒介ルミネセンス反応が選択的に抑制されることを可能にする。動作上、実験システムに正しい開始試薬を添加することによって、2つの酵素媒介ルミネセンス反応のうちの1つが最初に開始される。第1の酵素反応によって発生されたルミネセンス信号は次に上述のように測定される。第1の酵素反応は次に、同時に第1の酵素反応を抑制し、第2の酵素反応を開始する抑制及び活性化試薬を添加することによって特定的及び選択的に抑制される。第2の酵素反応によって発生されたルミネセンス信号は、次に第1の反応と同様の方法で測定される。このようにして、2つの異なる酵素によって媒介される2つのルミネセンス反応は、同じ反応容器の中で時間的に順次に分析されうる。

図式的には、ホタルルシフェラーゼは金属キレート化材、基質アナログ（例えばデヒドロルシフェリンといったルシフェリン）及びピロリン酸塩を使用して選択的に抑制される。相対的な抑制が大きく、望ましくは100,000倍であり、再生可能である限り、ルミネセンス反応の絶対抑制は必要ではない。これらの抑制試薬はホタルルシフェラーゼ又は他の甲虫ルシフェラーゼに特定的であり、実験的なシステム内に存在する他の種類のルシフェラーゼレポータには影響を与えない。従って、この例ではホタルルシフェラーゼ媒介反応である第1のルシフェラーゼ反応は、選択的に抑制され、一方レニラルシフェラーゼ媒介反応といった第2のルシフェラーゼ媒介反応は抑制なしに進行することが可能である。上

述の例は図示のためであり、いかなる方法でも制限的ではないと理解される。 20

上述のように、特定的な抑制及び活性化試薬は、選択的に1つのルミネセンス反応を抑制し、同時に第2のルミネセンス反応の開始をトリガし、異なるルミネセンスマーカ（例えば実験的なレポータ及び内部標準を提供する制御レポータ）はここで同じ試料の中で連像的に定量化されうる。この方法は規格マルチウェルプレート及び器具を使用して迅速で、自動化可能で、正確で、再生可能な結果を提供するためのレポータ多重化の動作を大きく促進させる。例えば、上述の複レポータ分析のより特定的な例では、ベータガラクトシダーゼ、ベータグルコシダーゼ及び、アルカリ性ホスファターゼ及び他のホスファターゼがホタルホスファターゼと共に複レポータルミネセンス分析の中で使用されうる。2つのルミネセンス酵素のうちの一方は内部標準として作用し、他方は遺伝子活性のための実験的なマーカとして作用する。 30

要約するに、本発明はルミネセンス反応の迅速で、効率的で再発可能な抑制を提供するよう調合された一般的及び特定的な試薬を説明する。この可能性は、従来のルミネセンス分析に対して2つの明らかな利点を有し、即ち：

- i)マイクロプレートルミネセンス分析のための効果で技術的に制限されたプラスチックウェアの使用の現在の問題点を除去し、
- ii)夫々のルミネセンス信号の定量化のための単一の器具を使用し、単一の試料管の中に含まれた1つの試料準備から多重ルミネセンス反応を実行する能力を与えることである。本発明は従って、従来の透明又は不透明なマルチウェルプレートを使用して、酵素媒介ルミネセンスレポータシステムに基づいて高スループット自動化分析を実施するために必要とされる技術を提供する。 40

本発明はまた、酵素媒介ルミネセンス反応を使用して試料を分析するための抑制試薬及び分析キットを含む。

本発明は、実験的な本質が測定され、光子の存在は暫時的であるため、ルミネセンス反応に理想的に適している。従って、光子の発生の原因となる酵素反応を抑制することは、試料の中の産出された光子を直ぐに減少させる。換言すれば、一度ルミネセンス測定が行われ、ルシフェラーゼ反応が抑制されると、光子の暫時の性質は、試料の中に産出された光子の蓄積がないことを意味する。本質的には、ルミネセンス反応は試料の中の実験的信号又は制御信号（即ち光子）の蓄積を残すことなく「ターンオフ」されうる。

同じことは、安定した化学産出物の蓄積が測定される、又は蓄積された化学産出物のゆつ 50

くりとした崩壊が測定されるアナログ式酵素反応について当てはまらない。ここでは、化学産出物をもたらす酵素反応を抑制することはまだ試料の中に化学産出物の大きな蓄積を残し、他の分析との干渉を試料から同時又は順次に行うことをもたらす。

上述の論議から、本発明は、特定的でなく酵素媒介ルミネセンス反応を抑制する試薬を提供することを目的とする。

本発明は、他の別の酵素媒介ルミネセンス反応に対して影響を与えることなく、選択された酵素媒介ルミネセンス反応を特定的に抑制する試薬を提供することを他の目的とする。

本発明は、特定的でなく酵素媒介ルミネセンス反応を抑制する試薬を使用した単レポータ酵素媒介ルミネセンス分析を提供することを更なる目的とする。

本発明は、第1の選択された酵素媒介ルミネセンス反応を特定的に抑制し、一方第2の別の酵素媒介ルミネセンス反応を同時に開始する試薬を使用した複レポータ酵素媒介ルミネセンス分析を提供することを更なる目的とする。

本発明は、ウェルの間で屈折又は反射クロストーク光汚染なしに透明又は不透明マルチウェルプレートの中で実行されうるルミネセンス分析を提供することを更なる目的とする。

本発明は、従来の実験室器具及び使い捨てのプラスチックウェアを使用して自動化可能な単及び複レポータルミネセンス分析を提供することを更なる目的とする。

本発明の上記及び他の目的は以下の「詳細な説明」及び請求項により明らかとなろう。

図面の詳細な説明

図1は透明なプラスチックの96ウェルマイクロプレートの中の単一のルミネセンス試料から放射される単一のクロストークを示す3次元グラフを示す。

図2は透明なプラスチックの96ウェルマイクロプレートの中の多数のルミネセンス試料から放射される信号クロストークの累積的な性質を示す3次元グラフを示す。

図3は、A)透明なプラスチックのマルチウェルプレートの中の隣接する試料の間の信号干渉の現象と、B)本発明の使用により信号クロストークの除去とを示す、2つの3次元グラフを合成した図である。

図4は本発明による抑制試薬を使用して3つの異なる生体からのルシフェラーゼによって触媒されたルミネセンス反応の一般的な抑制を示すグラフを示す。

図5はホタルルシフェラーゼを第1のレポータとして、レニラ(ウミシイタケ)ルシフェラーゼを第2のレポータとして使用する本発明により複ルシフェラーゼレポータ分析の結果を示す図である。

図6はコメツキムシルシフェラーゼを第1のレポータとして、レニラ(ウミシイタケ)ルシフェラーゼを第2のレポータとして使用する本発明による複ルシフェラーゼレポータ分析の結果を示す図である。

発明の詳細な説明

定義

簡潔性及び明瞭性のため、特記される以外は、文中に使用される「ルシフェラーゼ」及び「ルシフェリン」という用語は、以下の：ホタル*Photinus pyralis*から分離されたルシフェラーゼ又は他の甲虫ルシフェラーゼ(コメツキムシ(例えば*Pyrophorus plagiophthalmus*)又はツチボタル(*Pheogodidae spp*)から獲得されたルシフェラーゼ)、ウミシイタケ*Renilla reniformis*、小型甲殻類貝虫*Vargula hilgendorfii*、笠貝*Latia neriloides*及び*Xenorhabdus luminescens*及び*Vibrio fisherii*といった生体から分離されたバクテリアルシフェラーゼを含み、しかしこれらに限定されない全ての天然、合成又は遺伝子的に変換された源から生ずる全ての種類のルシフェラーゼを意味するものとする。第1乃至5に例挙され、明細書及び請求項の様々なセクションにおいて参照される幾つかの化学物質の名称は、省略形式で表示される。従って、用語の範囲及び詳細の明確で一貫した理解を提供することを支援するために以下の化学物質の略称の定義が与えられる。

10

20

30

40

省略表記

A P M B T

A P O - 1 0

A T P

甲虫ルシフェリン

化学物質

2 - (4 - アミノフェニル) -

6 - メチルベンゾチアゾール

ジメチルデシルfosfin

オキサイド

アデノシン 5' -

トリホスフェート

2 - (6' - ヒドロキシ -

	2' -ベンゾチアゾリル) -	
	△ ² -チアゾール-4-	
	カルボキシリック アシッド	
B S A	ウシ血清アルブミン	
B T	ベンゾチアゾール	
H A c	酢酸	
P B T	2-	10
	フェニルベンゾチアゾール	
C D T A	トランス-1, 2, -	
	ジアミノシクロヘキサン-1-	
	N, N, N', N' -	
	テトラアセティック	
	アシッド	20
デヒドロルシフェリン	2- (6' -ヒドロキシ- 2' -ベンゾチアゾリル) -	
	チアゾール-4-	
	カルボキシリック アシッド	
D T T	ジチオトレイトール	
E D T A	エチレンジアミンテトラ	30
	アセティック アシッド	
H P B T	2 (o-ヒドロキシフェニ- ル) ベンゾチアゾール	
H E P E S	N-2-ヒドロキシエチル ピペラジン-N' -2-	
	エタンスルホニック アシッド	
I F P I n k	万年筆インディアインク	40
N a ₄ P P i	テトラソディウム	
	ポロホスフェート	
o r - A T P	ホウ水素化物還元され、	

過ヨウ素酸酸化された、

アデノシン 5' -

トリホスフェート 2',

3' - アサイクリック

ジアルコール、

SDS

ドデシル硫酸ナトリウム

本発明は、少なくとも1つの酵素媒介ルミネセンス反応を開始する段階と、ルミネセンス反応によって発生されたルミネセンスエネルギーを定量化する段階と、ルミネセンス反応に少なくとも1つの抑制試薬を導入することによって酵素媒介ルミネセンス反応から放射される光子を抑制する段階とからなる酵素媒介ルミネセンス反応を分析する方法を含む。酵素媒介ルミネセンス反応はルシフェラーゼ媒介反応でありえ、その場合、反応はルシフェラーゼ媒介ルミネセンス反応からの光子放射を少なくとも1,000倍減少させることができ抑制試薬によって抑制されることが望ましい。

ルシフェラーゼ媒介反応は多数の異なる試薬によって抑制されえ、それらの試薬は以下の、ヨウ化物、ヨウ素、硫酸塩、硝酸塩、イソ-プロパノール、2-(4-アミノフェニル)-6-メチルベンゾチアゾール、ジメチルデシルfosfinオキサイド、ピロリン酸塩、ベンゾチアゾール、2-フェニルベンゾチアゾール、n-ブタノール、トランス-1,2,-ジアミノシクロヘキサン-N,N,N',N'-テトラアセティックアシッド、2-(6'-ヒドロキシ-2'-ベンゾチアゾリル)-チアゾール-4-カルボキシリックアシッド、エチレンジアミンテトラアセティックアシッド、2(0-ヒドロキシフェニル)ベンゾチアゾール、万年筆インディアインク、ホウ水素化物還元され、過ヨウ素酸酸化された、アデノシン 5' - トリホスフェート 2',3' - アサイクリックジアルコール、ドデシル硫酸ナトリウム、クエン酸、Tween^R 20、Triton^R X-100、及びそれらの混合物

からなる類から選択された1つ以上の抑制試薬を含む。

上述の抑制試薬は、以下の:SDS及びNa I;I₂及びNa I;Na₄PPi及びNa I;Na₄PPi,CDTA,及びAPMBT;Na₄PPi,APMBT,及びNa₂SO₄;Na₄PPi,CDTA,APMBT,及びNa₂SO₄;Na₄PPi及びAPMBT;Na₄PPi及びイソプロパノール;IFPインク及びAPMBT;APMBT及びCDTA;IFPインク及びCDTA;IFPインク及びNa₄PPi;SDS及びNa I;Tween^R 20及びNa I;Tween^R 20,Na I,及びn-ブタノール;Triton^R X-100及びNa I;及びそれらの混合物からなる類から選択された混合物を含む望ましい抑制試薬組成に調合されうる。

上述の混合物の中の化合物の望ましい最終的な分析濃度は以下の通りであり、即ち:0.33% (w/v) のSDS及び170mMのNa I;1.3mMのI₂及び45.5mMのNa I;25mMのNa₄PPi及び100mMのNa I;7.5mMのNa₄PPi,5.0mMのCDTA,及び12.5mMのAPMBT;7.5mMのNa₄PPi,12.5μMのAPMBT,及び200mMのNa₂SO₄;7.5mMのNa₄PPi,5.0mMのCDTA,12.5mMのAPMBT,及び200mMのNa₂SO₄;6.3mMのNa₄PPi及び3.1μMのAPMBT;6.3mMのNa₄PPi及び3.1% (v/v) のイソプロパノール;1/3,000xIFPインク及び3.1μMのAPMBT;3.1μMのAPMBT及び7.9mMのCDTA;1/3,000xIFPインク及び6.2mMのCDTA;1/3,000xIFPインク及び3.1mMのNa₄PPi;0.33% (w/v) のSDS及び170mMのNa I;0.33% (v/v) のTween^R 20及び170mMのNa I;0.33% (v/v) のTween^R 20,170mMのNa I,及び0.83% (v/v) のn-ブタノール;0.33% (v/v) のTriton^R X-100及び170mMのNa Iである。

ルシフェラーゼの中でも特に、本発明の方法は、*Photonus pyralis*ルシフェラーゼ及び*Pyrophorus plagiophthalmus*ルシフェラーゼを含む甲虫ルシフェラーゼによって媒介される分析ルミネセンス反応に対して使用されうる。調査の分野に広く使用され、本発明を使用して分析されうる他のルシフェラーゼは*Renilla reniformis*ルシフェラーゼによって触媒される反応である。

本発明はまた、第1の酵素によって媒介される第1の酵素媒介ルミネセンス反応が開始さ 50

れ、第1の反応のルミネセンスエネルギーが記録される、酵素媒介ルミネセンス反応を分析する複レポータ方法を含む。第1の酵素媒介ルミネセンス反応を選択的に抑制し、同時に第1の酵素媒介ルミネセンス反応とは別の第2酵素媒介ルミネセンス反応を開始することが可能な抑制及び活性化組成の導入が続く。次に第2の酵素媒介ルミネセンス反応によって発生されたルミネセンスエネルギーが測定される。随意の段階では、第2の酵素媒介ルミネセンス反応は次に続いて第2の抑制試薬の添加によって抑制されうる。

本発明はまた、主方法を実行するための試薬を含む単レポータ及び複レポータ分析キットを含む。単レポータキットは、望ましくは少なくとも1,000倍だけ酵素媒介ルミネセンス反応からの光子放射を抑制することが可能な少なくとも1つの抑制試薬組成からなる。少なくとも1つの抑制試薬組成は適当な第1の容器の中に置かれる。分析された酵素媒介ルミネセンス反応に対応する少なくとも1つの機能的な酵素基質は、その中に少なくとも1つの機能的な酵素基質が置かれている適当な第2の容器と共にキットの中に含まれている。キットはまたその使用説明書を含む。

複レポータキットは、適当な第1の容器の中に含まれて分析された第1の酵素媒介ルミネセンス反応に対応する第1の機能的な酵素基質を含む。第1の酵素媒介ルミネセンス反応からの光子放射を少なくとも1000倍だけ抑制することが可能な抑制試薬からなる抑制及び活性化組成と、第2の別の酵素媒介ルミネセンス反応に対応する第2の別の機能的な酵素基質は、適当な第2の容器の中に含まれる。複レポータキットもまたその使用説明書を含む。随意に、複レポータキットはまた適当な第3の容器の中に含まれた第2の抑制試薬を含みえ、第2の抑制試薬は第2の別の酵素媒介ルミネセンス反応を抑制することが可能である。

本発明はまた、酵素媒介ルミネセンス反応からの光子放射を減少させることが可能な酵素媒介ルミネセンス反応抑制試薬を含む。

透明なプラスチックのマルチサンプルプレートの中に含まれたルミネセンス反応の正確な定量化に対する光反射の影響について

分子生物学者用の調査ツールとして、ルミネセンス酵素レポータシステムは他の従来の酵素レポータシステムよりもより高感度である。ルシフェラーゼ分析は特に、他の酵素レポータシステムよりもはるかに迅速である。これらの特性は、ルミネセンス発生酵素を遺伝子及び生理学的活性の望ましいレポータとする。

ルミネセンスレポータに対する新しい応用は、現在96ウェルプラスチックマイクロプレートを使用した高スループット分析に基づいて現れている。しかしながら、透明なプラスチックの屈折性質は試料間で極端な光クロストークを引き起こし、ルシフェラーゼ分析の感度を悪化させている。前のルミネセンス反応に起因する信号干渉が0.1%を超過すればルミネセンスレポータシステムの力は大きく減少される。

図1及び図2は、透明なマルチウェルプレートに含まれた比較的明るいルミネセンス反応からの光屈折は、等距離の試料ウェルに対して容易に0.1%以上の信号干渉に起因することを示す。実際、高ルミネセンス活性を有する单一の試料の反応に隣接するウェルでは背景干渉は6%を超過する。幾つかの発光試料からの光屈折による累積背景干渉は更に大きい。従って、他の技術的及び経済的な利点にも拘わらず、透明なプラスチックにマルチウェルプレートは現在ルミネセンス分析を使用した高スループット分析には不適切である。

図1は透明なポリスチレンの極端な屈折性質を示すグラフである。以下詳述されるように、ホタルルシフェラーゼを発現する中国ハムスター卵巣(CHO)細胞のセル-フリーの抽出物が準備され、隣接する試料ウェルの中にクロストーク光干渉を発生するよう透明なプラスチックのマルチウェルプレートを通って伝わる光の一般的な現象を示すために使用される。透明なポリスチレンの96ウェルプレートの試料ウェル6Dの中で、20μlの抽出物は100μlのルシフェラーゼ分析試薬(米国ウィスコンシン州マジソンのPromega社)と結合される。单一のホタルルシフェラーゼ反応からのルミネセンスは4秒間に亘って光子放射を統合するようプログラムされたルミノスカンRTルミノメータ(フィンランド国ヘルシンキのLabsystems)を使用して全ての96試料ウェルの中で定量化される。ウェル6Dのみが活性ルシフェラーゼ反応を含むにも拘わらず、発光源から5つのカラムだけ離れた空の試料

10

20

30

40

50

中で有意義な信号（0.1%以上）が測定された。

図2に示されるように、透明なプラスチックのマイクロウェルプレートの遠隔ウェルの中の多数の発光試料の間のクロストークは、試料ウェルの間に累積信号干渉を引き起こす。ここでは、pGL3-制御（Promega社によって市販のホタルルシフェラーゼ発現エピゾーム：製品番号E1741）によってトランスフェクトされたCHO溶解物が、1mg/mlのBSAを含むレポータ溶解緩衝剤（Promega社）を使用して8の連続した1:0希釈物として準備される。29 10
μlの夫々のルシフェラーゼ希釈物はCorning社の透明なポリスチレン96ウェルプレートのカラム2,5,8及び11の試料ウェルの中に分与される。上述のように、Promega社のルシフェラーゼ分析試薬を順次に注入し、個々の試料ウェルからの光放射を定量化するために、Lab Systems社のルミノスカンRTルミノメータが使用される。

図2は、96ウェルプレートの夫々のウェルに対して測定された相対光単位（RLU）のグラフを示す。屈折及び散乱された光の高い割合は、活性ルミネセンス反応を有するカラムに隣接する試料の内カラムの中で測定される。ウェルA:3,6,9及び12（即ち高レベルのルミネセンス反応を含むウェルに直ぐに隣接する添加されたBLA試薬のみを含むウェル）の中では累積光クロストークは5乃至6%の範囲であり、一方ウェルH:3,6,9及び12（即ち低い光反応を含むウェルに直ぐに隣接する添加されたBLA試薬のみを含むウェル）の中で測定されたクロストークは17%を超える。ルミノメータは上から下へ試料のカラムを処理するため、ウェルA1乃至H1は、第1のルミネセンス反応（ウェルA2）がPromega社のルシフェラーゼ分析試薬の注入によって開始される前に測定される。従って、カラム1の中のウェルはプラスチックの燐光及び/又は器具の雑音によって引き起こされる背景信号がないことを確実にする便利な制御を提供する。20

上述のように、本発明はルミネセンス反応が従来の96ウェルの透明なプラスチックのマイクロタイプレートの中で実行されることを可能にすることを目的とする。図1及び2に示されるように、従来の透明なマルチウェルプレートでは、プレートの透明なプラスチックから周囲のウェルへ屈折された光によって引き起こされる信号クロストークによって、正確なルミネセンス測定は獲得されえない。本発明はこの問題を解決する。

本発明の第1の実施例では、一般的な抑制試薬を使用したルミネセンス分析が説明されている。「一般的な抑制試薬」という用語は、特定的でなく、ルシフェラーゼの源に関係なくルシフェラーゼ媒介ルミネセンス反応であることが望ましい、ルミネセンス反応を抑制する試薬を意味する。30

透明なプレートの隣接するウェルの中に含まれたルミネセンス反応の間の光屈折を効果的に除去するために、一般的な抑制試薬は夫々の試料に対してルミネセンス信号の最小で1,000倍の減少を提供するべきである。多数の個々のルミネセンス反応からの光クロストークの累積的な性質により、一般的な抑制試薬は夫々のルミネセンス反応からの光放射の10,000倍の減少を提供することが望ましい。

一般的な抑制試薬機能によって機能する機構は、本発明の機能性に対して決定的ではない。表示を容易にするため、出願人は幾つかの抑制試薬をその抑制の推定上の機能によって分類した。例えば幾つかの一般的な抑制試薬を列記する下記表1に示されるように、デヒドロルシフェリンといった幾つかの試薬は基質アノログであると考慮される。これらの試薬は、基質の酵素結合位置で結合することによって酵素反応を制限し、それにより酵素が予定された基質と結合することを防ぐ。40

一般的な抑制試薬はまたアニオン相互作用又はタンパク酵素の変性によって抑制的な効果を発するとされている。しかしながら上述のように、抑制現象の実際の機構は抑制が大きく再生可能である限り、本発明に対して決定的ではない。

ホタルルシフェラーゼのルミネセンス反応を抑制する能力に対する化合物の評価			
禁止剤の機能タイプ	試験された甲虫 ルシフェラーゼ抑制 (BLQ) 試薬	試験された試薬の 代表的分析濃度	残留するホタル ルシフェラーゼ活性の パーセント (%)
基質類縁体	デヒドロルシフェリン APMBT α _r -ATP BT PBT HPBT	飽和 7.6μM 7.6mM 3.0mM 0.15mM 30μM	0.064 0.33 0.78 2.3 7.5 44
	NaI Na ₄ PPi NaNO ₃ K ₂ HPO ₄ NaCl Na ₂ SO ₄	400mM 31mM 400mM 190mM 400mM 400 mM	0.078 0.12 2.1 8.3 8.3 10
	SOS APO-10 イソプロパノール	0.3% (w/v) 1.0% (w/v) 14.4% (v/v)	0.079 1.9 2.3
	万年筆インディアインク (IFP Ink) 家庭用漂白剤 COTA EDTA	1/1,280x 15.7% (v/v) 15.4mM 22.7mM	0.015 0.078 0.10 0.13
	Na ₄ PPi, NaI Na ₄ PPi, COTA, APMBT, Na ₂ SO ₄ Na ₄ PPi, COTA, APMBT Na ₄ PPi, APMBT, Na ₂ SO ₄ Na ₄ PPi, APMBT APMBT, IFP Ink APMBT, COTA IFP Ink, COTA IFP Ink, NaPPi イソプロパノール, Na ₄ PPi I ₂ , NaI イソプロパノール, APMBT	25mM, 100mM 7.5mM, 5.0mM, 12.5μM, 200mM 7.5mM, 5.0mM, 12.5μM 7.5mM, 12.5μM, 200mM 6.3mM, 3.1μM 3.1μM, 1/3,000x 1/3,000x, 6.2mM 1/3,000x, 3.1mM 3.1% (v/v), 6.3mM 1.3mM, 45.5mM 3.1% (v/v), 3.1μM	0.000043 0.00035 0.00097 0.0011 0.0035 0.0037 0.0041 0.0058 0.0073 0.15 0.27 0.35
	対照反応 : 禁止剤未添加 (100%)		
アниオン相互作用			10
一般的な タンパク質変性剤			
その他			
選択された 組み合わせ調合物			
30			

表 1

表 1 には单一の化学的本質からなる抑制試薬が示されているが、多数の異なる化学本質を含む抑制試薬を使用することによってより優れた結果が獲得される。従って、一般的なルミネセンス反応及び特にルシフェラーゼ媒介反応の最も効果的で有利な抑制をもたらすよう、抑制試薬は成分の化合物であることが望ましい。

表 1 に列記される様々な一般的な抑制試薬のうち、望ましい一般的な抑制試薬は、50mMのピロリン塩酸四ナトリウムと、200mMのヨウ化ナトリウムと、pH6.5である10mMのHEPESである。この成分の化合物は、甲虫ルシフェラーゼからのルミネセンス反応を迅速且つ効果的に抑制する。特に1:1の体積比でホタルルシフェラーゼ媒介反応に適用されたとき、この化合物は元の信号のわずか0.000043%の残留ルミネセンス信号を残す。

図3-Bは、夫々のルミネセンス測定の後に、続くウェルの中に含まれるルミネセンス反応を活性化させる前に夫々のウェルの中に、50mMのNa₄PPi、200mMのNaI及び10mMのHEPES (pH6.5) からなる同等の容量の一般的な抑制試薬が注入されたことを除いては、図2に示される実験と全く同じ実験の結果を示す。図3-Bを図3-Aと比較することによって明らかに示されるように、発光ウェルと暗いウェルとの間のクロストークは完全に除去されている。

一般的な抑制試薬の添加による透明なプラスチックのマルチウェルプレートの中で実行されるルミネセンス分析の定量化の精密度への影響は、下記表2に示されている。これらのデータは、ルシフェラーゼ溶液の連続的な希釀物を標準的な透明なポリスチレン96ウェルプレートの中に配置し、ここで説明される方法で光度を測定することによって獲得される。平均ルミネセンス値は、全てのルミネセンス反応が抑制されないままであり、従って安定したルミネセンスを放射し続ける、図3-Aのマルチウェルプレートの夫々の列に含まれる4つの発光試料に対して決定される。平均ルミネセンス値はまた、全ての前のルミネセンス反応が抑制された、図3-Bのマルチウェルプレートの夫々のウェルの中の4つの試料に対して決定される。夫々の平均値の間の差は、抑制されていないマルチウェルプレートの中に含まれる夫々の試料に対して測定された信号のパーセント誤差の決定を可能にする。

10

表 2

列中の試料	測定された平均ルミネセンス値		抑制されないルミネセンス試料に起因するパーセント誤差
	抑制されない発光反応	抑制された発光反応	
A	4,023	3,948	1.9%
B	2,183	1,971	11%
C	1,177	1,005	17%
D	617	482	28%
E	333	243	37%
F	176	119	48%
G	106	59.7	77%
H	58.7	28.6	105%

表2は、累積信号クロストークによる相対誤差は、予期されるように低活性ルミネセンス反応を定量化する場合に大きく重大となることを表わす。

ルシフェラーゼ触媒ルミネセンス反応の一般的な抑制の試薬調合

多数の化合物は、ルシフェラーゼ触媒ルミネセンス反応を迅速に抑制するための能力について、個々に及び結合されて試験された。表1及び表3は夫々、試験された化合物の代表的な濃度として、ホタルルシフェラーゼ及びレニラルシフェラーゼの潜在力を示す。試験化合物の添加の後に測定された残留ルミネセンス信号のパーセンテージはその抑制効率を示す。個々に、又は様々な濃度で結合されて使用されているかに拘わらず、有用な抑制調合物はルシフェラーゼ反応からのルミネセンスを、開始ルミネセンス放射の1,000倍だけ減少させる、即ち0.1%にすることが可能であるべきである。

20

ホタルルシフェラーゼ反応は、ルシフェラーゼ分析試薬と、Promega社によって市販されるルシフェラーゼ分析システムキット（米国ワイオミング州マジソン；キット番号 # 4030）に含まれるプロトコルを使用して実行される。制御及び抑制されたホタルルシフェラーゼ反応の両方からのルミネセンス（表1）は、以下のようにして準備された、pGL3-制御を発現するCHO細胞の抽出物を使用して実行された。対照反応は、10-乃至20 μ lの抽出物を100 μ lのPromega社のルシフェラーゼ分析試薬を含むルミノメータ管の中に分与し、光放射を定量化することによって実施される。実験的な反応は個々のルミネセンス反応に対して、ここでは甲虫ルシフェラーゼ抑制（BLQ）試薬の包括的な名称を与えられた50 μ lの候補抑制試薬を添加することによって実施される。2つ以上の化学物質からなる調合物は、添加された抑制試薬の体積は100 μ lに増加されることを除いては同様に実施される。制御及び抑止ホタルルシフェラーゼ反応のルミネセンス強度は、Turner Designs社（米国カリフォルニア州サンベイ）の20e型ルミノメータを使用して10秒間に亘って光子フラックスを統合することによって定量化される。

30

40

禁止剤のタイプ (RLQ) 試験されたレニラルシフェラーゼ抑制	試験された化合物の代表的分析濃度 (%)	試験された化合物の代表的分析濃度 (%)	残留レニラルシフェラーゼ活性のパーセント (%)
pHシフト 一般的なタンパク質変性剤	クエン酸, pH 3 SDS Tween [®] 20 Triton [®] X-100 n-ブタノール	6.67mM 0.33% (w/v) 0.33% (v/v) 0.33% (v/v) 1.67% (v/v)	5.3 0.00029 3.4 3.1 4.5
その他	NaI	330mM	5.9
選択された組み合わせ調合物	I ₂ , NaI SDS, NaI Tween [®] 20, NaI Tween [®] 20, n-ブタノール, NaI Triton [®] X-100, NaI Tween [®] 20, クエン酸, pH 3 Tween [®] 20, n-ブタノール Tween [®] 20, n-ブタノール, クエン酸, pH 3	.93mM, 33mM 0.33% (w/v), 170mM 0.33% (v/v), 170mM 0.33% (v/v), 130mM 0.33% (v/v), 170mM 0.33% (v/v), 6mM 0.33% (v/v), 0.83% 0.33% (v/v), 0.83% 0.33% (v/v), 0.83% (v/v), 2.67mM	0.000053 0.00067 0.00081 0.00084 0.022 0.89 1.4 1.4

对照反応 : 禁止剤未添加 (100%)

表 3

レニラルシフェラーゼのルミネセンス反応を抑制する能力に対する化合物の評価

10

20

30

40

レニラルシフェラーゼ反応は、100 μl の精製レニラルシフェラーゼ（典型的には0.3 μg/mlに希釈された75mMのHEPES、0.02%のBSA;pH8）を、等しい体積のレニラ基質溶液（7.5mMの酢酸ナトリウム、10mMのCDTA、400mMの硫酸ナトリウム、25 μMのAPMBT、15mMのピロリン酸ナトリウム、2 μMのコエレンテラジン;pH5.5）を含むルミノメータ管に添加することによって実行される。光子放射は上述のように定量化された。表3中に要約された個々及び結合された化学調合物は、100 μl の試験溶液をルミネセンス反応に追加し、次に上述のように残留光放射を定量化することによってレニラルシフェラーゼを抑制する能力

50

について評価された。

基質アナログを使用してホタルルシフェラーゼルミネセンスを抑制する効果は、他の甲虫ルシフェラーゼによって触媒されるルミネセンス反応に対して適当に拡張されうる。その共通の基質条件及び反応化学物質に加え、甲虫ルシフェラーゼは共通の進化系統であり、少なくとも45%のタンパクシーケンス相同を表わす。従って、甲虫ルシフェリンの基質アナログ及び1つの甲虫ルシフェラーゼを抑制する表1に示される他の化学物質は、発光甲虫の多くの種のいずれかから精製されたルシフェラーゼのルミネセンス反応の抑制に対して同様に潜在力を有する。従って、一般的なBLQ試薬は、甲虫ルシフェラーゼ反応からのルミネセンス強度の少なくとも1000倍の減少を引き起こすそれらの構成化学物質の全ての結合と同様、表1に示される代表的な調合物を含む。

図4は、1つの甲虫ルシフェラーゼ（北米ホタル即ち*Photinus pyralis*のルシフェラーゼ）の反応空のルミネセンスを抑制することが可能な試薬は、別の甲虫系統のルシフェラーゼ（ジャマイカコメツキムシ、即ち*P. plagiophthalamus*のルシフェラーゼ）によって触媒されるルミネセンス反応を抑制するために同様の潜在力を有する。*P. plagiophthalamus*は進化上最も*P. pyralis*から離れた発光甲虫であり、従って2つの甲虫ルシフェラーゼは甲虫ルシフェラーゼの範囲全体を表す。図4のY軸は対数的であることに注意すること。抑制されないホタル分析は、ホタルルシフェラーゼを発現する哺乳綱細胞の抽出物を20μl、100μlのPromega社のルシフェラーゼ分析試薬を含むルミノメータ管に添加することによって実行される。抑制されないコメツキムシルシフェラーゼ分析は、酵素試料が精製されたコメツキムシルシフェラーゼを1mg/mlのBSAを含むPromega社のレポータ溶解緩衝剤の中に約5μg/mlに希釈することによって得られる。両方の甲虫ルシフェラーゼは、制限されない対照反応の測定の直後に、100μlのBLQ試薬をルミノメータ管に添加することによって抑制される。この例では、BLQ試薬は10mMのHEPESと、50mMのNa₄PPiと、200mMのNa⁺とからない、pH6.5である。制御（即ち100等量）及び抑制された甲虫ルシフェラーゼの両方からルミネセンスは、410倍の濃度フィルタが取り付けられたTurner Designs社（米国カリフォルニア州サニーベイル）のルミノメータを使用して10秒間に亘って光放射を統合することによって定量化される。

図4はまた、ウミシイタケ（*Renilla reniformis*）から分離されたルシフェラーゼが、表3に要約されるように、選択されたレニラルシフェラーゼ抑制（RLQ）試薬調合物の追加によって効率的に抑制されることを示す。制御ルミネセンス反応（100%等量）は、マシユーズ緩衝剤（1977年マシユーズ他による、0.5MのNaCl、0.1MのK₂HPo₄、1.0mMのNa₂EDTA、0.02%のBSA; pH7.6）の中で0.3μg/mlに希釈された20μlの精製されたレニラルシフェラーゼを、1μMベンジルコエレンテラジンを含むマシユーズ緩衝剤に添加することによって実行される。レニラルミネセンス反応は続いてルミノメータ管に、この例では0.66%のSDSによって構成される100μlのRLQ試薬を添加することによって抑制される。制御及び抑制されたレニラルシフェラーゼ反応の両方からのルミネセンスは、上述のようにルミノメータを使用して定量化される。

ホタル、コメツキムシ及びレニラルシフェラーゼによって触媒されるルミネセンス反応を抑制する能力は、図4に示されるように、進化的に異なったルシフェラーゼ酵素によって触媒されるルミネセンス反応は選択された化学剤によって効率的に抑制されることが可能であることを示す。

甲虫ルシフェラーゼの選択的な抑制のための試薬調合

統合された複酵素レポータ分析の概念（即ち順次的な測定）には、第2のルミネセンスレポータの活性が抑制されないよう第1レポータ酵素からのルミネセンスを効率的に抑制する必要性が内在する。従って、ホタル反応からルミネセンスを抑制するために非常に高い潜在力を有すが、レニラルシフェラーゼによって触媒される続くるルミネセンス反応では能動的な成分として存在しうる抑制試薬が必要とされる。甲虫ルシフェラーゼ活性化（BLA）試薬の選択された化学成分と、表1において候補甲虫ルシフェラーゼ抑制（BLQ）試薬として確認される化学物質は、更にレニラルシフェラーゼによって触媒されるルミネセンス反応と共に有しうる全ての抑制的な相互作用を査定するため評価される。表4は、レニ

10

20

30

40

50

ラルシフェラーゼのルミネセンス活性に対するこれらの選択された化学物質の影響を要約する。ホタル反応に対する潜在的な抑制的な影響のため、ピロリン酸ナトリウム (Na_4PPi) が最初に試験される。2 μM のベンジルコエレンテラジン及び15mMの Na_4PPi が補われた100 μl のマシュー緩衝剤は、100 μl のマシューズ緩衝剤の中に約3ngの精製されたレニラルシフェラーゼを含むルミノメータ管の中に分与され、ルミネセンスは定量化される。ピロリン酸ナトリウムを含まない対照反応と比較される場合、この化合物はレニラルシフェラーゼによって触媒されたルミネセンス反応に対して抑制的な影響を及ぼさないことが明らかである。従って、全ての他の化学物質は以下のように Na_4PPi と結合されて試験され、即ち:75mMのトリシン (pH8)、500mMのNaCl、1mMのEDTAの溶液の中の約0.3 $\mu g/ml$ に希釈された100 μl の精製されたレニラルシフェラーゼは、ルミノメータ管の中に分与される。ルミネセンス反応は、15mMの Na_4PPi (pH5.5) と2 μM のベンジルコエレンテラジンからなる100 μl のレニラ基質溶液を、表4に示される試験試薬の幾つかの濃度のうちの1つと結合させて添加することによって活性化される。

レニラルシフェラーゼのルミネセンス反応との適合に対するBLA及び
BLQ試薬調合物からなる化学薬品の評価

10

20

試験された化合物	試験された化合物の代表的分析濃度	レニラルシフェラーゼ活性のパーセント (%)
Na_2SO_4 , Na_4PPi	400mM, 7.5mM	187
$NaCl$, Na_4PPi	400mM, 7.5mM	154
$MgSO_4$, Na_4PPi	2mM, 7.5mM	107
CDTA, Na_4PPi	10mM, 7.5mM	107
コエンザイムA, Na_4PPi	135uM, 7.5mM	107
Na_4PPi	7.5mM	102
メタノール, Na_4PPi	2.5% (v/v), 7.5mM	101
ルシフェリン, Na_4PPi	240uM, 7.5mM	100
APMBT, Na_4PPi	12.5uM, 7.5mM	98.5
ATP, Na_4PPi	265uM, 7.5mM	94.9
DTT, Na_4PPi	15mM, 7.5mM	78.5
IFP Ink, Na_4PPi	1/3000x, 7.5mM	65.2
イソプロパノール, Na_4PPi	2.5% (v/v), 7.5mM	61.7
デヒドロルシフェリン, Na_4PPi	2.5mM, 7.5mM	49.9
Nal, Na_4PPi	0.4M, 7.5mM	40.0

対照反応 : 化学薬品の添加されないマシューズ緩衝剤 (100%)

30

表 4

40

複ルシフェラーゼレポータ分析

本発明の第2の実施例では、2つ以上の別の酵素と、酵素のうちの1つに対して特定的な抑制試薬とを使用するルミネセンス分析が説明される。第2の実施例では、全てのルミネセンス反応を抑制する一般的な抑制試薬を導入するのではなく、酵素媒介ルミネセンス反応の1つの型のみを特定的に抑制する試薬が、試料細胞に添加される。そのような抑制試薬は特定抑制試薬と称され、第2の酵素媒介ルミネセンス反応を同時に開始するよう追加的に調合される場合、抑制及び活性化試薬と称される。

この分析では、ホタルルシフェラーゼ及びレニラルシフェラーゼといった2つの別の酵素を含む試料、又は他の別の酵素の組合せが分析される。まず、試料ウェルの中に2つの酵

50

素のうちの 1 つのための活性化試薬が添加され、上述のように結果としてのルミネセンスが測定される。次にウェルの中に特定の抑制及び活性化試薬が添加される。試薬は第 1 の酵素媒介反応を特定的に抑制し、同時に第 2 の酵素媒介反応を活性化する。或いは、同時に試料ウェルの中に、特定抑制試薬及び第 2 の酵素媒介ルミネセンス反応に特定的な第 2 の光活性化試薬が添加される。次に第 2 の反応からのルミネセンスが第 1 の反応の場合と同様に測定される。随意に、試料からのルミネセンスは、試料に対して一般的な抑制試薬を添加することによって完全に抑制されうる。

このようにして、本発明は単一の試料の中で 2 つの別のパラメータを測定することが可能な多ルミネセンス分析を提供する。上述のように、1 つの酵素媒介反応は内部標準として作用しうる一方で、他の酵素媒介反応は遺伝子マーカ又は他の実験的な変数として機能しうる。

甲虫ルシフェラーゼ (1991年 Woods) 及びレニラルシフェラーゼ (1977年マシューズ他) の活性を定量化するために使用される従来の分析化学作用は両立しない。本発明は、レニラルシフェラーゼ分析をホタル又はコメツキムシルシフェラーゼ反応の分析と融合した新しい化学調合物を実施し、従って新しい複ルシフェラーゼレポータ分析を形成する。これらの調合物はここでは、甲虫ルシフェラーゼ活性化 (BLA) 試薬と、甲虫ルシフェラーゼ抑制及びレニラルシフェラーゼ活性化 (BLQRLA) 試薬という包括的な名称が与えられる。BLA試薬 (75mMのHEPES、4mMのMgSO₄、20mMのDTT、100 μMのEDTA、530 μMのATP, 270 μMのCoA、470 μMの甲虫ルシフェリン;pH8.0) は、Promega社の技術プレティン番号101の中で開示される (米国ウィスコンシン州マジソンのPromega社から市販される) ルシフェラーゼ分析試薬調合物の派生物である。BLA試薬はホタルルシフェラーゼのルミネセンス反応を維持し、後にレニラルシフェラーゼ反応からの最大ルミネセンス活性を促進する際にBLQRLA試薬を補足するよう調合される。

下記表 5 は、試験された様々なBLQRLA試薬の代表的な調合物を示し、i) ホタルルシフェラーゼ反応からのルミネセンスを選択的に抑制すること、及びii) 最大のレニラルシフェラーゼルミネセンスを活性化し、維持することに関する夫々の効率を要約する。分析は、ホタルルシフェラーゼを発現するCHO細胞から準備された細胞抽出物を使用して実行され (以下に詳述)、更に精製されたレニラルシフェラーゼ (約0.3 μb/ml) によって補われた。従って、準備された抽出物は、単細胞生体が実際に同時に 2 つの別のルシフェラーゼレポータ酵素を発現する実験的な条件をシミュレートする。レニラルシフェラーゼ活性を決定する反応は、まず10 μl の抽出物を100 μl のBLA試薬 (75mMのHEPES、4mMのMgSO₄、20mMのDTT、100 μMのEDTA, 530 μMのATP、270 μMのCoA、470 μMの甲虫ルシフェリン;pH 8.0) を含むルミノメータ管に分与し、次に様々なBLQRLA試験試薬のうちの 1 つを100 μl だけ添加することによって実施された。BLQRLA試薬は、表 5 に示される試験混合物のうちの 1 つと結合された7.5mMの酢酸 (pH5.0) によって構成される。レポータ # 1、即ちホタルルシフェラーゼ媒介ルミネセンス反応の100%対照値は、指定されたBLQRLA試薬の添加の前に上述の反応からの光放射を定量化することによって決定される。レポータ # 2、即ちレニラルシフェラーゼ媒介ルミネセンス反応の100%対照値は、制御BLQRLA試薬 (7.5mMの酢酸、15mMのNa₄PPi、400mMのNa₂SO₄、2 μMのコエレンテラジン;pH5.0) が1:1の体積比でホタルルシフェラーゼ反応に追加された複レポータ分析形式を使用して決定された。図 5 及び 6 は、異なる甲虫ルシフェラーゼ反応 (レポータ # 1) が定量化され、次にレニラルシフェラーゼ (レポータ # 2) のルミネセンス反応を付隨的に活性化し、維持する試薬を添加することによって選択的に抑制される状況に適用した本発明を示す図である。

10

20

30

40

甲虫ルシフェラーゼ抑制及びレニラルシフェラーゼ活性化 (BLQRLA) 試薬の評価

BLQRLA試験試薬 (及び結合されたBLQ試薬)	分析濃度	残留ホタル ルシフェラーゼ活性 率(%)	レニラルシフェラーゼ 活性のパーセント(%)
Na ₄ PPI	7.5mM	1.0	-
Na ₄ PPI + コエレンテラジン	7.5mM, 1μM	-	65.83
Na ₄ PPI, APMBT	7.5mM, 12.5μM	0.001	-
Na ₄ PPI, APMBT, コエレンテラジン	7.5mM, 12.5μM, 1μM	-	53.1
Na ₄ PPI, CDTA	7.5mM, 10mM	0.13	-
Na ₄ PPI, CDTA, + コエレンテラジン	7.5mM, 10mM, 1μM	-	64.66
Na ₄ PPI, CDTA, APMBT	7.5mM, 5.0mM, 12.5μM	0.0002	-
Na ₄ PPI, CDTA, APMBT, + コエレンテラジン	7.5mM, 5.0mM, 12.5μM, 1μM	-	58.5
Na ₄ PPI, APMBT, Na ₂ SO ₄	7.5mM, 12.5μM, 200mM	0.00075	-
Na ₄ PPI, APMBT, Na ₂ SO ₄ , + コエレンテラジン	7.5mM, 12.5μM, 200mM, 1μM	-	92.36
Na ₄ PPI, CDTA, Na ₂ SO ₄	7.5mM, 10mM, 200mM	0.048	-
Na ₄ PPI, CDTA, Na ₂ SO ₄ , + コエレンテラジン	7.5mM, 10mM, 200mM, 1μM	-	100.52
Na ₄ PPI, CDTA, APMBT, Na ₂ SO ₄	7.5mM, 5.0mM, 12.5μM, 200mM	0.0001	-
Na ₄ PPI, CDTA, APMBT, Na ₂ SO ₄ , + コエレンテラジン	7.5mM, 5.0mM, 12.5μM, 200mM, 1μM	-	90.4
Na ₄ PPI, Na ₂ SO ₄ , + コエレンテラジン	7.5mM, 200mM	0.23	-
Na ₄ PPI, Na ₂ SO ₄ , + コエレンテラジン	7.5mM, 200mM, 1μM	-	100

対照反応#1 : BLA試薬のみ (100%)
対照反応#2 : (3.75mM HAc, 7.5mM Na₄PPI, 200mM Na₂SO₄, 1μM コエレンテラジン; pH5.0) (100%)

表 5

これらの例は、複ルシフェラーゼ分析の独特な、統合された性質を明確に示す。両方のルミネセンスレポータ酵素の活性は、同じ器具を使用して、単一の管の中に含まれた同じ試料の中から迅速に定量化される。図4と同様、図5及び6のY軸は対数的である。

図5は、本発明の複ルシフェラーゼレポータ形式を使用してホタル及びレニラルシフェラーゼの測定された活性を(相対光単位; RLUで)示す図である。2つの混合されたルシフェラーゼのルミネセンス活性は、同じ器具を使用して、同じ試料管から順次に測定された。以下説明されるように、ホタルルシフェラーゼを発現するセル-フリーの抽出物が準備さ

れ、更に約0.3ng/mlの濃度で精製されたレニラによって補われた。レポータ#1、即ちホタルルシフェラーゼの活性は、100μlのBLA試薬に20μlの細胞抽出を添加することによって測定された。ホタルルミネセンスは、410倍の濃度フィルタが取り付けられた試料室を有するTurner Designs社（米国カリフォルニア州サンベイブル）のルミノメータを使用して10秒間に亘って光放射を統合することによって定量化される。レポータ#2、即ちレニラルシフェラーゼの活性は、100μlのBLQRLA試薬と同じルミノメータ管の中に注入することによって同じ試料から決定された。図5及び6のため、BLQRLA試薬は15mMのNa₄PPi、7.5mMの酢酸ナトリウム、10mMのCDTA、400mMのNa₂SO₄、25μmのAPMBT、1%のメタノール、2μMのコエレンテラジン; pH5.0からなる。レニラ触媒反応のルミネセンス強度は、ルミノメータに対する調節の必要なしに、BLQRLA試薬の添加の直後に定量化される。

抑制されたホタルルシフェラーゼ反応からの残留ルミネセンスは、ルミネセンス背景にレニラルシフェラーゼ反応の測定された活性値に起因するその反応を割り当てるために独立して決定される。コエレンテラジンを含まないことを除き、全ての面に関してBLQRLA試薬の調合物と同様の試薬が準備される。前と同様、この調合物は、「甲虫ルシフェラーゼ抑制（BLQ）試薬」と称される。ホタルルシフェラーゼによって触媒されるルミネセンス反応は、前と同様、20μlの準備された溶解物を100μlのBLA試薬に添加することによって活性化される。100μlのBLA試薬は次に試料管の中に直ぐに注入され、残留ホタルルシフェラーゼが測定された。0.0004%の残留ルミネセンス活性が、ホタルルシフェラーゼ反応の続く抑制に対しても残存することが測定された。従って、この例では、第2のルシフェラーゼレポータ酵素反応から測定されたルミネセンス信号の約0.0004%が、第1のルシフェラーゼレポータ酵素からの信号干渉に起因する。

図6は、本発明の複ルシフェラーゼレポータ形式を使用したジャマイカコメツキムシ及びレニラルシフェラーゼの測定された活性を（RLUで）示す図である。2つの混合されたルシフェラーゼのルミネセンス活性は、同じ器具を使用して同じ試料管から順次に測定された。精製されたコメツキムシ及びレニラルシフェラーゼは、0.5mgBSA/mlを含むPromega社のレポータ溶解緩衝剤の中で夫々約5μg/mlに希釈される。20μlの酵素混合物がルミノメータ管に含まれる100μlのBLAに添加され、レポータ#1（コメツキムシルシフェラーゼ）からのルミネセンス信号は、410倍の濃度フィルタが取り付けられたTurner Designs社のルミノメータを使用して10秒間に亘って光放射を統合することによって定量化される。レポータ#2、即ちレニラルシフェラーゼの活性は、100μlのBLQRLA試薬と同じルミノメータ管の中に注入することによって同じ試料から決定された。BLQRLA試薬の調合物は、ホタルルミネセンスの抑制について上述されたものと同じであり、付随的にレニラルシフェラーゼ反応を活性化する。

抑制されたコメツキムシ反応からの残留ルミネセンスは、背景信号のパーセンテージにレニラルシフェラーゼ反応の測定された活性値に起因するその反応を割り当てるために独立して決定される。決定の及びBLQ試薬の調合の方法は、ホタルルシフェラーゼレポータ分析に対して説明されたものと同じである。この例では、レニラルシフェラーゼ反応に対して決定されたルミネセンス値の0.004%以下が、前のコメツキムシルシフェラーゼ反応からの信号干渉に起因する。

要約するに、複ルシフェラーゼ分析の統合された化学作用は、個々のルミネセンス信号を、単一の試料の中で発現された2つの同様でないルシフェラーゼレポータ酵素の反応から区別する能力を提供する。典型的には完了するまで35秒を必要とする複ルシフェラーゼ分析の説明的は概要は以下の通りである：

- 1.ルミノメータの中に準備された細胞抽出物を含む管を配置し、
- 2.試料管にBLA試薬を添加し、
- 3.甲虫ルシフェラーゼ活性を定量化し（レポータ#1:実験値）、
- 4.同じ試料管にBLQRLA試薬を添加し、
- 5.レニラルシフェラーゼ活性を定量化する（レポータ#2:内部制御値）。

この概要は説明のためであり、いかなる方法でも本発明の範囲を制限するものではない。

上述の表及び幾つかの以下の例は、ホタルルシフェラーゼを暫時に発現する培養された哺乳綱細胞から準備された抽出物の使用を含意する。全ての場合、中国ハムスター卵巣(CHO)細胞は25mlのDMEM + FBS培養基(10%の胎児ウシ血清によって補われたDulbeccoの修正ワシ培養基)を含む75cm²ポリスチレン培養フラスコの中で培養される。培養フラスコは約90%のコンフルエンスが観察されるまで、37¹⁰で、5%のCO₂の環境で定温放置される。成長培養基は除去され、細胞は、市販されるトリプシンEDTA溶液の1:10希釀によって補われる5mlのハンクの平衡塩類溶液によって覆われる。トリプシン溶液は、添加の30秒後に吸引され、細胞は2分間37¹⁰で定温放置される。細胞は培養フラスコを10mlの体積のDMEM + FBS培養基によって洗浄することによって採取される。細胞タイマーが決定され、16.5mlの最終的な細胞懸濁液体積を獲得するために充分なDMEM + FBSを含む50mlの消毒されたスクリューキャップ式の管に移される。別の準備では、10μgのホタルルシフェラーゼ発現エピゾームpGL3-制御(米国ウィスコンシン州マジソンのPromega社)を含む900μlの250mMのCaCl₂が、900μlの2X HEPES緩衝剤に添加された。結果としての1.8mlの体積のコロイドDNA/リン酸カルシウムが、準備された16.5mlの細胞懸濁液に添加される。結合された懸濁液は迅速に混合され、6mlのアリコートが直ぐに夫々の3つの100cm²円形のポリスチレン培養プレートの中に分与される。夫々のプレートは、6.7×10⁵の細胞と同量の、3.3μgのホタルルシフェラーゼをコード化するエピゾームDNAを含む。処理された細胞は30時間の間37²⁰で5%のCO₂の環境で定温放置される。

抽出物は、成長培養基を吸引し、粘着性の細胞を10mlのリン酸塩緩衝された塩水(PBS; 13.7mMのNaCl、2.68mMのKCl、1.47mMのKH₂PO₄、8.1mMのNa₂HP0₄; pH7.4)で1回洗浄し、400μlのPromega社のレポータ溶解緩衝剤を添加し、プラスチックの細胞リフターで強くかき集めることによって準備される。加工されていない溶解は1.5mlのマイクロフュージ管に移され、冷蔵されたマイクロフュージ管の中で14,000rpmで回転させることにより細胞組織片が除去される。

全ての細胞培養に適した構成要素、即ち10xトリプシンEDTA及び塩の溶液はGibcoBRL社(米国メリーランド州ガイザースバーグ)によって市販されている。全てのプラスチックウェアはCorning社(米国ニューヨーク州コーニング)によって市販されている。CaCl₂及びHEPES緩衝剤はレポータ溶解緩衝剤と共にProfection Mammalian Transfection Systemの構成要素であり、Promega社(米国ウィスコンシン州マジソン)によって市販されている。

例
例1:

透明樹脂マイクロプレートの遠隔ウェル中の複数のルミネセンス試料からの光屈折による累積信号干渉、及びルミネセンス反応の読み取り後抑制による光屈折の除去

図3-Aは、変化するルミネセンス強度の32の試料のみを含む96ウェルの透明樹脂プレートの各ウェルから測定されたRLU値のプロットである。透明樹脂のマイクロウェルプレートの遠隔ウェル中の多数のルミネセンス試料間の信号クロストークの一般的な現象、そして累積的影響を示す。

pGL3-制御でトランスフェクションされたCHO細胞の調整された溶解産物が、図2に記載されたように、透明の96ウェルのプレートの変化する試料カラムの8つのウェルのそれぞれの中に分与された。前記のように、プレートは連続的にプロメガルシフェラーゼ分析試薬を注入して96ウェルのそれぞれからルミネセンスを測定するようにプログラムされたプレート読み取りのルミノメータ中に装填された。受容不能な高いパーセンテージの屈折されて散乱された光が、活性なルミネセンス反応を伴う列に隣接する空のウェル列(即ち、列3、4、6、7、9、10及び12)の信号干渉として測定される。この例において、列1の空の試料ウェル中では信号干渉は測定されないが、それらはプロメガルシフェラーゼ分析試薬を注入されて第一のルミネセンス反応(ウェルA2)が開始される前にルミネセンス活性が測定されるためである。

図3-Bは、ルミノメータが100μlの甲虫ルシフェラーゼ抑制(BLQ)試薬を試料測定の直後に更に注入するようにプログラムされた以外は、図3-Aにおいて記載されたのと同

様に調整され処理された96ウェルの透明樹脂プレートの各ウェルから測定されたRLU値のプロットである。BLQ試薬は表1に示された調合物から生成され、この例においては、pH6.5で10mMのHEPES, 50mMのNa₄PPi, 200mMのNa⁻からなる。図3-Bは、透明のマルチウェルのプレート中に含まれたルミネセンス反応の読み取り後の抑制が、先行する試料からの光のクロストークを抑制することにより信号の干渉を効果的に除去することを納得のいくように立証する。

例2:

透明のマルチウェルのプレート中の抑制されないルミネセンス試料からの光信号の正確な測定への影響

表2は、一般的に抑制試薬が前のルミネセンス反応を消光するために利用されない場合に、透明のマルチウェルのプレート中に含まれたルミネセンス試料の組から測定された光信号に対して決められたパーセント誤差を示す。平均ルミネセンス信号は、図3-A中に示された抑制されないマルチウェルのプレートの各列中の4つの試料に対して決められ、その後、図3-Bの抑制されたマルチウェルのプレート中に含まれたそれぞれの試料の組に対し決められた値と比較された。抑制されない反応からの信号の干渉は列A中の試料から測定された全光信号（平均ルミネセンス値4,000RLU）に対して2%より少ない寄与であるが、列H中の試料から測定された平均信号（平均ルミネセンス値100RLU）に対して100%より大きく寄与することが示される。このように、試料ウェル間の累積的な光のクロストークの逆の傾向は、高いルミネセンス活性を持つ試料とは反対に、低活性の発光試料からの信号を測定する場合により大きな影響を持つ。実際、透明のマルチウェルのプレート中の累積的な光のクロストークから生じる極端な背景信号は、低度の光の試料の正確な測定を不可能にし、適当なルミネセンス抑制試薬が無い場合、発光分析のためのより望ましい透明樹脂のマルチウェルのプレートの使用を初めから不可能にする。

例3:

3種の発生物からのルシフェラーゼにより触媒されたルミネセンス反応の素早い、一般的な抑制のための試薬

図4は3種の異なるルシフェラーゼにより触媒されたルミネセンス反応に対する選択された抑制試薬の添加の後で測定された残留するルミネセンス活性のパーセントを示す。表1及び3から生成された甲虫ルシフェラーゼ抑制(BLQ)及びレニラルシフェラーゼ抑制(RLQ)試薬調合物は、2種の陸生生物、北アメリカホタル(Photinus pyralis:フォチヌスピラリス)及びジャマイカコメツキムシ(Pyrophorus plagiophthalmus:ピロフォラスプラジオフタラムス)並びに海の生物、ウミシイタケ(Renilla reniformis)から精製されたルシフェラーゼのルミネセンス活性の抑制のために使用された。

コメツキムシ及びホタルのルシフェラーゼ反応は、前記されたプロメガ(Promega)のルシフェラーゼ分析システムキット(Promega Corp.製品#E4030)の構成要素として提供されたルシフェラーゼ分析試薬及びレポータ溶解緩衝剤を使用して行なわれた。ホタル及びコメツキムシのルシフェラーゼにより触媒されるルミネセンス反応を抑制するためにこの例において使用されたBLQ試薬の調合物はpH6.5の10mMのHEPES, 50mMのNa₄PPi, 及び200mMのNa⁻である。レニラルシフェラーゼのルミネセンス反応の定量化は前記されたように行なわれ、0.66%のSDSからなる同体積のRLQ試薬を添加することにより実質的に抑制された。対照(100%相当)ルミネセンス反応と試験された3種のルシフェラーゼのそれぞれに対する抑制された反応の両方の定量化は、前のセクション中に記載されたように、ターナー・デザインズ(Turner Designs)のルミノメータを使用して行なわれた。

例4:

統合された複ルシフェラーゼレポータの分析:

ホタルルシフェラーゼ及びレニラルシフェラーゼのルミネセンス反応の連続測定

図5は、本発明の統合された複レポータの型を使用して測定されたホタル及びレニラルシフェラーゼの活性(RLU)を示す。二つの混合されたルシフェラーゼのルミネセンス活性は、同じ装置を使用して同じ試料管から連続的に測定された。

pGL3-制御DNAでトランスフェクションされ、その結果ホタルルシフェラーゼを発現す

10

20

30

40

50

るCHO細胞が調製され、更に前記したように、精製されたレニラ ルシフェラーゼで補充された。ホタルルシフェラーゼであるレポータ#1の活性は、20μlの調製された抽出物を100μlの甲虫ルシフェラーゼ活性化(BLA)試薬に添加することにより測定された。ルミネセンス強度は、410倍中間濃度のフィルターを取り付けられたターナー デザインズのルミノメータを使用して10秒間に亘って、光の放射を統合することにより定量化された。レニラ ルシフェラーゼであるレポータ#2の活性は、100μlの甲虫ルシフェラーゼ抑制&レニラ ルシフェラーゼ活性化(BLQRLA)試薬を同じルミノメータ管に注入することにより同じ試料から決められた。レニラ ルシフェラーゼ反応のルミネセンス強度は、ルミノメータの調整の必要なく、ホタルの反応の場合と同じ方法で定量化された。一般に、本発明の形式は、両方のルシフェラーゼレポータ酵素のルミネセンス活性を測定するのに 10 35秒以下が必要である。

抑制されたレポータ#1の反応からの残留ルミネセンスが、レポータ#2に対して決められた活性値に寄与した信号干渉の程度を決めるために測定された。ホタル ルシフェラーゼのルミネセンス反応は前もって活性化され、その後100μlのBLQ試薬がその試料管中に直ぐに注入され、残留するホタルルシフェラーゼの活性が測定された。0.0004%より少ない残留ルミネセンス活性が、続くホタルルシフェラーゼ反応の抑制に対しても残存することが測定された。

BLA, BLQRLA及びBLQ試薬調合物の詳細な説明は前のセクションに記載される。

例5:

統合された複ルシフェラーゼレポータの分析:

20

コメツキムシ ルシフェラーゼ及びレニラ ルシフェラーゼのルミネセンス反応の連続測定

図6は、本発明の統合された複レポータの型を使用して測定されたコメツキムシ及びレニラ ルシフェラーゼの活性(RLU)を示す。レポータ#1(コメツキムシ ルシフェラーゼ)及びレポータ#2(レニラ ルシフェラーゼ)のルミネセンス活性は、レポータ#1からの残留ルミネセンスの決定と同様、例4中に記載されたように管理された。この例において、0.0004%より少ない残留ルミネセンス活性が続くコメツキムシ ルシフェラーゼ反応の抑制に対しても残存することが測定された。

本発明はここに記載された特定の試薬調合物、段階、又は方法により限定されず、むしろ添付された請求の範囲の範囲内に来るようなその全ての形態を含む。

30

文献目録

Blaise,C.他の(1994年の)BioTechniques:16巻の932-937頁。

Bronstein,他の(1991年の)Bioluminescence and ChemiluminescenceのCurrent Status.(編集PE Stanley及びL.J.Kricka)John Wiley & Sons,Inc.の73-82頁。

Bronstein,I.他の(1994年の)Anal - Biochem.:219巻の169-191頁。

Denburg,他の(1969年の)Archive of Biochemistry and Biophysics:134巻の381-394頁。

Denburg,J.L.及びmcElroy,W.D.の(1970年の)Archives of Biochemistry and Biophysics:141巻の668-675頁。

Flanagan,W.M.他の(1991年の)J.Virology:65巻の769-786頁。

40

Jain,V.K.及びMagrath,I.T.の(1992年の)BioTechniques:12巻の681-683頁。

Kobatake,他の(1993年の)Bioluminescence and Chemiluminescence(編集A.A.Szalay,他)John Wiley & Sons,Chichesterの337-341頁。

Kondepudi,T.他の1994年の12月10-14日のサンフランシスコ,CAでのAmerican Society of Cell Biologistの年会で示されたポスターの要旨#725。

Leckie,F.他の(1994年の)BioTechniques:17巻の52-57頁。

Lee,他の(1970年の)Archives of Biochemistry and Biophysics:141巻の38-52頁。

Mathews,J.C.他の(1977年の)Biochemistry:16巻の85-91頁。

Schaap,他の(1989年の)Clinical Chemistry:35巻の1836-1864頁。

Schramの(1991年の)Bioluminescence and ChemiluminescenceのCurrent Status.(編集 50

PE Stanley及びL.J.Kricka) John Wiley & Sons, Inc.の407 - 412頁。

Thompson, J.F., 他の (1991年の) Gene: 103巻の 171 - 177頁。

Thorp, 他の (1986年の) Methods in Enzymology: 133巻の 331 - 353頁。

Wardの (1985年の) Chemi - and Bioluminescence (編集 John Burr) Marcel Dekker, Inc., ニューヨークの 321 - 358頁。

Woodの (1995年の) Curr. Op. Biotech.: 6巻の 50 - 58頁。

Wood, Kの (1991年の) Bioluminescence & Chemiluminescenceの Current Status. (編集 Stanley, P.E. 及び Kricka, J.) John Wiley & Sons, Chichester 中の 543 - 546頁。

【図4】

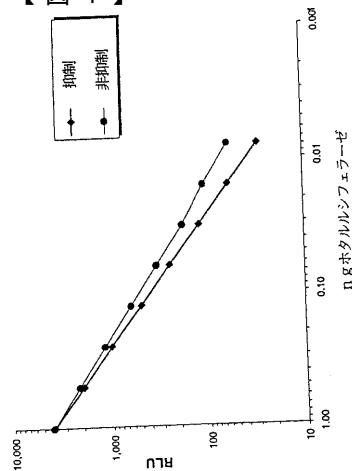


FIG. 4

【図1】

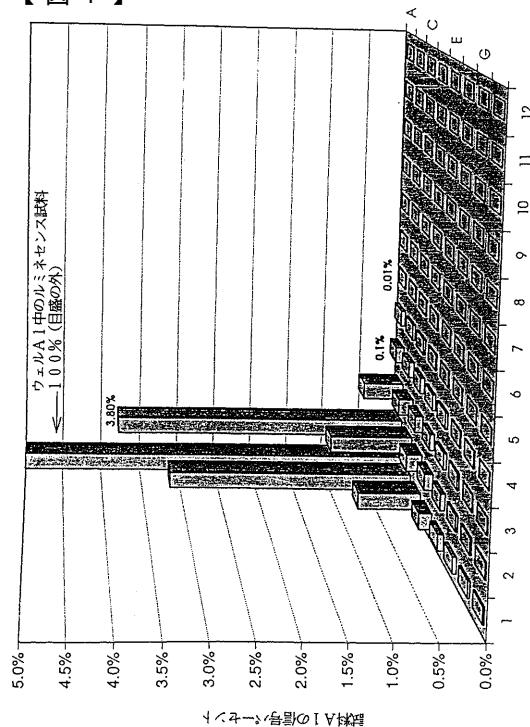


FIG. 1

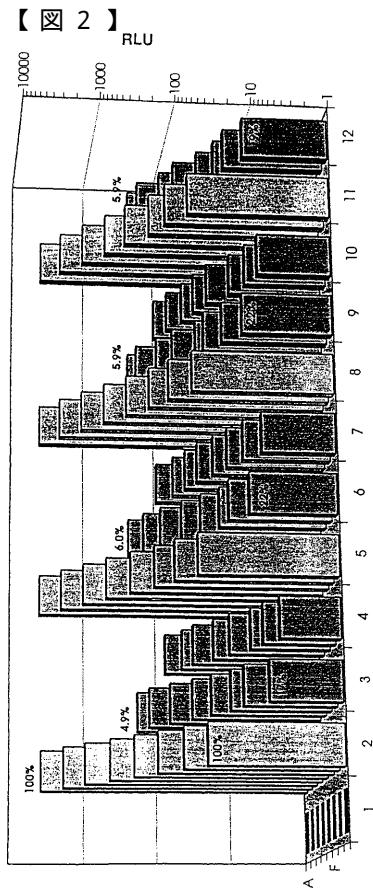


FIG. 2

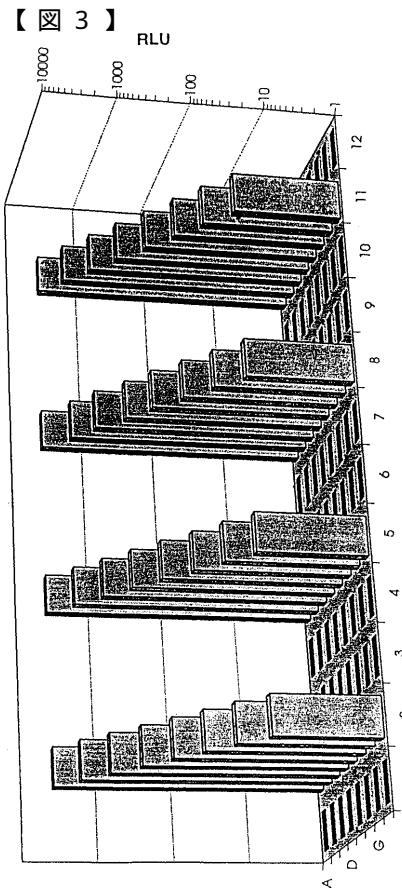


FIG. 3

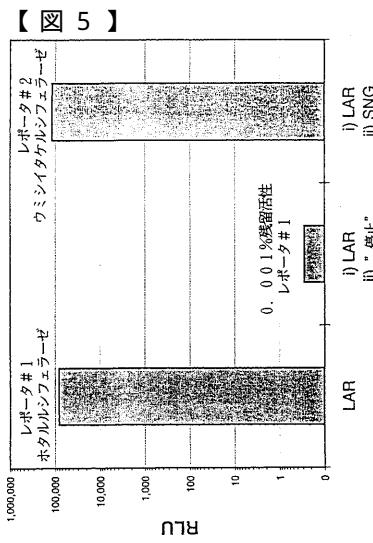


FIG. 5

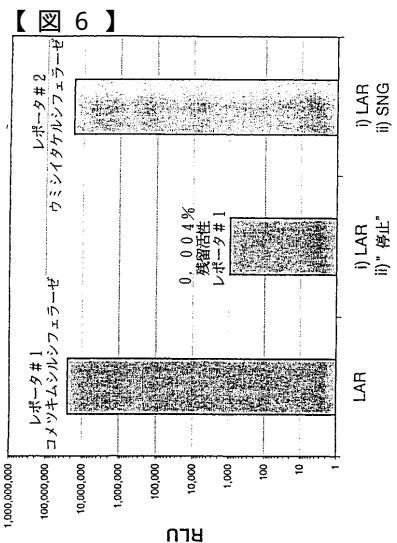


FIG. 6

フロントページの続き

(72)発明者 シエンボーン, エレイン ティー
アメリカ合衆国, ウィスコンシン州 53562, ミドルトン, セイジブラッシュ・トレイル 7
853番

審査官 斎藤 真由美

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

C12Q 1/00 - 70
G01N 21/00 - 33/98
PubMed
BIOSIS/WPI (DIALOG)
EUROPAT (QUESTEL)