

膜小胞輸送アッセイプロトコール (蛍光化合物)

本プロトコールは、以下の ABC Transporter Vesicle Products と Reagent Kit を用いた膜小胞輸送アッセイのプロトコールです。

- ABC Transporter Vesicle Products

Human MDR1	(GenoMembrane, Cat. No. GM0015)
Mouse Mdr1a	(GenoMembrane, Cat. No. GM0004)
Human MRP2	(GenoMembrane, Cat. No. GM0001)
Rat Mrp2	(GenoMembrane, Cat. No. GM0002)
Mouse Mrp2	(GenoMembrane, Cat. No. GM0022)
Dog Mrp2	(GenoMembrane, Cat. No. GM0014)
Monkey Mrp2	(GenoMembrane, Cat. No. GM0018)
Human MRP3	(GenoMembrane, Cat. No. GM0021)
Human BCRP	(GenoMembrane, Cat. No. GM0008)
Rat Bcrp	(GenoMembrane, Cat. No. GM0007)

- ABC Transporter Vesicle Product for Negative Control

Control	(GenoMembrane, Cat. No. GM0003)
---------	---------------------------------

- Vesicular Transport Assay Reagent Kit

For MRPs and BCRP	(GenoMembrane, Cat. No. GM3010)
For MDR1	(GenoMembrane, Cat. No. GM3030)

ご自身で膜小胞輸送アッセイのための試薬を調製する場合はホームページから入手可能な「バッファーの調製方法」をご参照下さい。(<http://www.genomembrane.com/protocol.html>).

目次

1. 膜小胞輸送アッセイ	3
2. 製品内容	4
2.1. ABC Transporter Vesicle Products 凍結品 (5 mg/mL, 500 µL)	4
2.2. Vesicular Transport Assay Reagent Kit (for MDR1)	4
2.3. Vesicular Transport Assay Reagent Kit (for MRPs and BCRP)	4
3. 使用機器および消耗品	5
3.1. 機器	5
3.2. 消耗品	5
3.3. 蛍光基質化合物	5
4. 蛍光基質化合物および試薬の準備	6
4.1. 蛍光基質化合物	6
4.2. 試薬	6
5. アッセイ手順	7
6. データ解析	8
7. 推奨品	9
7.1. 消耗品	9
7.2. 蛍光基質	9
8. 参考文献	10

1. 膜小胞輸送アッセイ

ABC Transporter Vesicle Products は、バキュロウイルスを用いて ABC transporter を昆虫由来 Sf9 細胞に発現させ、同細胞より分離した細胞膜画分を、膜小胞輸送実験 (vesicular transport assay) 用に調製した製品です。ABC Transporter Vesicle Products では、膜画分の一部が反転膜小胞 (inside-out vesicles) の構造をとっています。ABC transporter は、ATP 加水分解エネルギーを駆動力として、基質となる化合物を細胞内から細胞外へと輸送することから、反転膜小胞では反応溶液中の基質を小胞内へと輸送します。小胞内に輸送された 1) ラジオアイソトープ、2) 蛍光標識された化合物あるいは 3) 非標識化合物の量を、目的に合わせた検出器、1) 液体シンチレーションカウンター、2) 蛍光プレートリーダーあるいは 3) LC-MS 参考文献などで測定することにより、小胞内に輸送された化合物の輸送活性を簡便に、直接評価することが可能です。

本プロトコールでは、蛍光化合物を用いた膜小胞輸送アッセイをご紹介します。MDR1 には *N*-Methylquinidine (NMQ) を、MRP2 および MRP3 には 5(6)-Carboxy-2', 7'-dichlorofluorescein (CDCF) を、BCRP には Lucifer yellow (LFY) を使用する例をお示しします。また、Glutathione が基質と共に MRP2 により共輸送される場合があることが知られておりますので、本プロトコールでは反応液中に Glutathione が終濃度 2 mM となるように添加してあります。

ご使用になる基質によっては Sf9 細胞膜内因性の輸送活性や蛍光化合物の非特異的な吸着などにより、バックグラウンドの測定値が高くなる場合がありますので、より詳細な検討では Control (Cat. No. GM0003) との比較測定を行うことを推奨いたします。

2. 製品内容

2.1. ABC Transporter Vesicle Products 凍結品 (5 mg/mL, 500 µL)

- － 膜小胞輸送アッセイには1アッセイに50 µgのタンパク質を使用します。したがって1製品で50アッセイが可能です。
 - * 保管温度 -80 °C
 - * 有効期間はデータシートに記載されております。
- － 製品データシート

2.2. Vesicular Transport Assay Reagent Kit (for MDR1)

- ・ Buffer A2：反応用バッファー (6 mL ×1 本)
[組成] 50 mM MOPS-Tris, 70 mM KCl, 7.5 mM MgCl₂
- ・ 10× Buffer B2：10× 反応停止用および洗浄用バッファー (20 mL ×1 本)
[組成] 400 mM MOPS-Tris, 700 mM KCl
 - **Buffer Bは超純水で10倍希釈し、アッセイまで冷やして保管ください。**
- ・ Reagent C2：10 mM MgATP 溶液 (1.3 mL ×2 本)
- ・ Reagent D2：10 mM MgAMP 溶液 (1.3 mL ×2 本)
- ・ Reagent E：10% sodium dodecyl sulfate (SDS) (13 mL ×1 本)
 - **Reagent Eは保存環境によっては沈殿が生じることがあります。その際は37 °Cに温めてください。**
- ・ Reagent F (検出用試薬)：0.1 N H₂SO₄ (11 mL ×1 本)
 - 試薬 A～D は-20 °C、E 及び F は室温での保存を推奨しております。
 - 各試薬は、製品箱ラベル上に記載されている使用期限内に御使用下さい。

2.3. Vesicular Transport Assay Reagent Kit (for MRPs and BCRP)

- ・ Buffer A2：反応用バッファー (6 mL ×1 本)
[組成] 50 mM MOPS-Tris, 70 mM KCl, 7.5 mM MgCl₂
- ・ 10× Buffer B2：10× 反応停止用及び洗浄用バッファー (20 mL ×1 本)
[組成] 400 mM MOPS-Tris, 700 mM KCl
 - **Buffer Bは超純水で10倍希釈し、アッセイまで冷やして保管ください。**
- ・ Reagent C2：10 mM MgATP 溶液 (1.3 mL ×2 本)
- ・ Reagent D2：10 mM MgAMP 溶液 (1.3 mL ×2 本)
- ・ Reagent G：200 mM Glutathione 溶液 (0.1 mL ×1 本)
 - 試薬 A～D, G は-20 °Cでの保存を推奨しております。
 - 各試薬は、製品箱ラベル上に記載されている使用期限内に御使用下さい。

以下に記載の弊社推奨アッセイ手順の場合、試薬キットは1キット100アッセイに十分な量を含んでおりますのでABC Transporter Vesicle Products 2本に対して1キットとなります。

3. 使用機器および消耗品

3.1. 機器

- 37 °C ウォーターバス
- マルチチャンネルピペット
- マイクロピペット
- 吸引ろ過装置一式
- 遠心機
- 蛍光プレートリーダー

3.2. 消耗品

- ピペット、チップ
- 希釈、調製及び反応用の容器 (1.5 mL 及び 8 連チューブなど)
- 96 ウェルガラス繊維フィルタープレート
- 蛍光測定用プレート

3.3. 蛍光基質化合物

トランスポーター	蛍光基質化合物
MDR1	<i>N</i> -Methylquinidine Iodide (NMQ)
MRP2, MRP3	5(6)-Carboxy-2', 7'-dichlorofluorescein (CDCF)
BCRP	Lucifer yellow (LFY)

4. 蛍光基質化合物および試薬の準備

4.1. 蛍光基質化合物

50 μ M NMQ	NMQ を Buffer A2 に溶解し、50-1000 μ M のストック溶液を作製する。使用まで-20 $^{\circ}$ C、暗所にて保存する。 NMQ 溶液を Buffer A2 で 50 μ M に希釈して使用する。
50 μ M CDCF	CDCF を有機溶媒 (できれば dimethylformamide) に溶解し、10-100 mM のストック溶液を作製する。 ストック溶液を Buffer A2 で希釈し、50 μ M CDCF 溶液を作製する。
100 μ M LFY	LFY を超純水に溶解し、10 mM のストック溶液を作製する。 ストック溶液を Buffer A2 で希釈し、100 μ M LFY を作製する。

* アッセイを行う前に調製した蛍光基質化合物溶液を用いて 1 ウェルあたり 4 万 arbitrary unit/5 μ L 以上の蛍光強度が得られるようにご利用の蛍光プレートリーダーの励起エネルギーおよび検出時間を調整されることを推奨いたします。

4.2. 試薬

必要に応じて以下の Reagent E や検出用試薬の調製を行ってください。

試薬	使用箇所	目的
Reagent E (10% SDS)	5 (10) (12)	ABC Transporter Vesicle を可溶化し、フィルタープレートから抽出します。
Reagent F (0.1 N H ₂ SO ₄)	5 (13)	NMQ 用の検出用試薬
0.1 N NaOH	5 (13)	CDCF 用の検出用試薬
Dimethylsulfoxide	5 (13)	LFY 用の検出用試薬

* 被験化合物によっては被験化合物自身の特性により蛍光基質化合物と同波長帯で蛍光を発する可能性がありますので、試験実施前に被験化合物自身の蛍光強度の有無を確認されることを推奨いたします。

5. アッセイ手順

以下は、被験化合物を用いて各トランスポーターの ATP 依存的な蛍光基質化合物輸送阻害効果を評価する際の標準的な手順です。各蛍光基質化合物の最終濃度は **6. データ解析** に示しています。

反応液における各溶液の量は試験系に応じて適宜、調整してください。

- (1) 5 mg/mL ABC Transporter Vesicle Products を以下の通りに混合し、氷上で反应用チューブに 20 μ L ずつ分注する。

<ベシクル溶液>	(1 反応あたり)	(16 反応分として)
ABC Transporter Vesicle Products (5 mg/mL)	10 μ L	160 μ L
Buffer A	10-x μ L	160-16x μ L
被験化合物	x μ L	16x μ L
	(Total 20 μ L/assay)	(Total 320 μ L)

- (2) アッセイミックスを以下の通りに混合し、氷上に保存する。

<アッセイミックス>	(1 反応あたり)	(8 反応分として)
Reagent C あるいは D	20 μ L	160 μ L
蛍光基質化合物溶液	5 μ L	40 μ L
Reagent G (試験によっては Buffer A)	0.5 μ L	4 μ L
Buffer A	4.5 μ L	36 μ L
	(Total 30 μ L/assay)	(Total 240 μ L)

◆ 被験化合物（阻害剤）溶液を添加する際には、目的に応じて (1) あるいは (2) の操作時に添加します。添加の際には Buffer A の添加量を調整し、1 反応あたりの反応液総量を 50 μ L に合わせます。本手順では (1) の操作で添加するケースを記載しています。

- (3) ベシクル溶液 および Reagent C あるいは D を含む各 アッセイミックス を、それぞれ 37 $^{\circ}$ C で 5 分間プレインキュベーションする。
- (4) 20 μ L の ベシクル溶液 が入った反应用チューブに各 アッセイミックス を 30 μ L 加えて混合し、反応を開始する。
- (5) 反应用チューブを 37 $^{\circ}$ C でインキュベーションする。反応時間は ABC Transporter Vesicle Products 製品の各製品データシートを参考にする。
- (6) 氷冷した Buffer B を 200 μ L 加え反応を停止させた後、吸引ろ過を行うまで氷上に置く。
- (7) 以下の手順で反応溶液を 96 ウェルガラス繊維フィルターで吸引ろ過する。
- 7-1) 96 ウェルガラス繊維フィルタープレートの全ウェル (使用しないウェルも含む) に 200 μ L/well の Buffer B を加え、吸引ろ過する (pre-wet 操作)。
- 7-2) マルチチャンネルピペットを用い、反応液をガラス繊維フィルタープレートに移し、吸引ろ過する。
- 7-3) フィルターを氷冷した Buffer B で 200 μ L/well \times 5 回洗浄する。
- 7-4) 4.1. で調製した蛍光基質化合物溶液を未使用ウェルのフィルターに 5 μ L 添加する。

* 良好な結果を得るために (6) から (7) の操作を素早く行ってください。

- (8) 96 ウェルガラス繊維フィルタープレートの下部に残っている液体を丁寧にふき取る。
- ◆ 96 ウェルガラス繊維フィルタープレートの下部が濡れていると、(10), (11)で行う 10% SDS による抽出時に他のウェルへ混入し、正しい結果を得ることができません。
- (9) 蛍光測定用プレートの上に 96 ウェルガラス繊維フィルタープレートを重ねる。
- (10) フィルタープレートの各ウェルに 50 μ L の Reagent E (10% SDS) を加える。
- (11) フィルタープレートを蛍光測定用プレートに重ねたまま 550 \times g で 1 分間遠心し、可溶化したベシクル溶液を蛍光測定用プレートに集める。
- (12) (10) と (11) を繰り返す。
- (13) ベシクル溶液が入った蛍光測定用プレートの各ウェルに 100 μ L の 検出用試薬を加える。
- (14) プレートリーダーで蛍光強度を測定する。

6. データ解析

- (1) 1 ウェルあたりの蛍光基質化合物量 (pmol) を以下の式を用いて計算する。

$$\text{1 ウェルあたりの基質量 (pmol)} = \frac{\text{各ウェルの蛍光強度}}{\text{総蛍光強度}^{*1}} \times \text{反応溶液中の基質量 (pmol)}^{*2}$$

*1; 7-4) 参照

*2; 反応液中の基質量 (pmol) は以下の様になります。

	基質	最終濃度	反応溶液中の基質量
MDR1	NMQ	5 μ M	250 pmol (= 50 μ M \times 5 μ L)
MRP2	CDCF	5 μ M	250 pmol (= 50 μ M \times 5 μ L)
MRP3	CDCF	5 μ M	250 pmol (= 50 μ M \times 5 μ L)
BCRP	LFY	10 μ M	500 pmol (= 100 μ M \times 5 μ L)

- (2) MgATP を添加した反応での基質量 (pmol) から、MgAMP を添加した反応における値を差し引き、ATP 依存的な基質輸送量 (pmol) を求める。
- (3) 算出された ATP 依存的な基質輸送量 (pmol) を、使用したタンパク質量 (mg) および反応時間 (min) で割り、単位タンパク質量および単位時間当たりの ATP 依存的な基質輸送量 (pmol/min/mg protein) を得る。
- (4) 基質輸送量 (pmol/min/mg protein) を基質濃度 (μ M) で除し、基質輸送容量 (μ L/min/mg protein) を得る。

7. 推奨品

7.1. 消耗品

	メーカー名	製品名
96 ウェルガラス繊維フィルタープレート	PALL	AcroPrep™ 96-well Filter Plates, 350 µL, 1.0 µm, glass fiber (#8031)
吸引ろ過装置	Millipore	MultiScreenHTS Vacuum Manifold
蛍光測定用プレート	Nunc	U96 Microwell plate black (#267342, etc.)

7.2. 蛍光基質

– *N*-Methylquinidine (NMQ)

MW	374.90
分子式	C ₂₁ H ₂₇ ClN ₂ O ₂
λ _{ex}	355 nm
λ _{em}	448 nm
メーカー名	Sigma #SBNMQ

– 5(6)-Carboxy-2', 7'-dichlorofluorescein (CDCF)

MW	445.21
分子式	C ₂₁ H ₁₀ Cl ₂ O ₇
λ _{ex}	495 nm
λ _{em}	529 nm
メーカー名	Invitrogen #C368

– Lucifer yellow (LFY)

MW	521.56
分子式	C ₁₃ H ₉ K ₂ H ₅ O ₉ S ₂
λ _{ex}	427 nm
λ _{em}	535 nm
メーカー名	Invitrogen #L1177

8. 参考文献

- Iwanaga T, Nakakariya M, Yabuuchi H, Maeda T, and Tamai I. Involvement of bile salt export pump in flutamide-induced cholestatic hepatitis. *Biol Pharm Bull.* **30** (4): 739-44 (2007).
- Yabuuchi H, Tanaka K, Maeda M, Takemura M, Oka M, Ohashi R, and Tamai I. Cloning of the dog bile salt export pump (BSEP; ABCB11) and functional comparison with the human and rat proteins. *Biopharm Drug Dispos.* **29** (8): 441-8 (2008).
- Kato Y, Takahara S, Kato S, Kubo Y, Sai Y, Tamai I, Yabuuchi H, and Tsuji A. Involvement of multidrug resistance-associated protein 2 (Abcc2) in molecular weight-dependent biliary excretion of beta-lactam antibiotics. *Drug Metab Dispos.* **36** (6): 1088-96 (2008). ⇒LC-MS/MS analysis
- Yamaguchi K, Murai T, Yabuuchi H, and Kurosawa T. Measurement of the transport activities of bile salt export pump using LC-MS. *Anal Sci.* **25** (9): 1155-8 (2009). ⇒LC-MS analysis
- Yamaguchi K, Murai T, Yabuuchi H, and Kurosawa T. Measurement of transport activities of bile acids in human multidrug resistance-associated protein 3 using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Sci.*; **26** (3): 317-23 (2010). ⇒LC-MS/MS analysis
- van Staden CJ, Morgan RE, Ramachandran B, Chen Y, Lee PH, and Hamadeh HK. Membrane vesicle ABC transporter assays for drug safety assessment. *Curr Protoc Toxicol.* Chapter 23:Unit 23.5 (2012)
- Morgan RE, van Staden CJ, Chen Y, Kalyanaraman N, Kalanzi J, Dunn RT 2nd, Afshari CA, and Hamadeh HK. A multifactorial approach to hepatobiliary transporter assessment enables improved therapeutic compound development. *Toxicol Sci.* **136** (1): 216-41 (2013)



GenoMembrane

〒230-0052 神奈川県横浜市鶴見区生麦 2-3-18

Tel:045-508-2326 Fax:045-716-8884

URL: <http://www.genomembrane.com>

E-mail: info@genomembrane.com