

膜小胞輸送アッセイプロトコール
(非標識化合物)

本プロトコールは、以下の ABC Transporter Vesicle Products (HEK) 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 (HEK)

Human MRP1	(GenoMembrane, Cat. No. GM0110)
Human MRP2	(GenoMembrane, Cat. No. GM0101)
Human MRP3	(GenoMembrane, Cat. No. GM0121)
Human MRP4	(GenoMembrane, Cat. No. GM0112)
Human BSEP	(GenoMembrane, Cat. No. GM0105)
- ABC Transporter Vesicle Product for Negative Control

Mock	(GenoMembrane, Cat. No. GM0103)
------	---------------------------------
- Vesicular Transport Assay Reagent Kit for HEK (GenoMembrane, Cat. No. GM3100)

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「バッファの調製方法」をご参照下さい。(<https://www.genomembrane.com/protocol-jp>).

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 (HEK) 凍結品 (5 mg/mL, 500 µL)	4
2.2. Vesicular Transport Assay Reagent Kit for HEK	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. 非標識基質化合物	5
4. 溶液調製	6
4.1. 非標識基質化合物溶液の調製	6
5. アッセイ手順	6
6. データ解析	7
7. 推奨品	8
7.1. 消耗品	8
8. 参考文献	9

1. 膜小胞輸送アッセイ

ABC Transporter Vesicle Products (HEK) は、ABC transporter を HEK293F™ 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 (HEK) 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 (RI)、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/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、非標識化合物を用いた膜小胞輸送アッセイをご紹介します。MRP1, MRP2, MRP3, MRP4 には Estradiol-17- β -D-glucuronide (E₂17 β G) を、BSEP には Taurocholic acid (TCA) を使用する例をお示しします。

膜小胞内に輸送された基質は、フィルターろ過により反応液中に残った基質と分離後、LC/MS/MS 装置にて基質濃度を測定することにより定量します。

また、Glutathione が基質とともに MRP1, MRP2 および MRP4 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 を終濃度 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 HEK293F™ 細胞膜内因性の輸送活性や標識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 Mock (Cat.No. GM0103) 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 (HEK) 凍結品 (5 mg/mL, 500 μ L)

— 膜小胞輸送アッセイには1アッセイに50 μ g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 $^{\circ}$ 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 HEK

- Buffer A : 反応用バッファー (6 mL \times 1 本)
[組成] 50 mM MOPS-Tris, 70 mM KCl, 7.5 mM MgCl₂
- 10 \times Buffer B : 10 \times 反応停止用および洗浄用バッファー (20 mL \times 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 C : 10 mM MgATP 溶液 (1.3 mL \times 2 本)
- Reagent D : 10 mM MgAMP 溶液 (1.3 mL \times 2 本)
- Reagent G : 200 mM Glutathione 溶液 (0.1 mL \times 1 本)
 - 各試薬は-20 $^{\circ}$ Cで保存ください。
 - 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 (HEK) 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
- LC-MS/MS 装置

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
- 96 ウェルプレート (遠心除水用)
- 96 ウェルディープウェルプレート
- マイクロプレート用キャップマット

3.3. 非標識基質化合物

MRP1, MRP2, MRP3, MRP4	Estradiol-17 β -D-glucuronide (E ₂ 17 β G)
BSEP	Taurocholic acid (TCA)

4. 溶液調製

4.1. 非標識基質化合物溶液の調製

	基質溶液	調製	最終濃度
MRP1 MRP3	0.2 mM E ₂ 17βG in dimethylsulfoxide (DMSO)	E ₂ 17βG Sodium Salt (MW: 470.49) を DMSO で溶解し、0.2 mM 溶液にする。	1 μM
MRP2	10 mM E ₂ 17βG in DMSO	E ₂ 17βG Sodium Salt (MW: 470.49) を DMSO で溶解し、10 mM 溶液にする。	50 μM
MRP4	0.6 mM E ₂ 17βG in DMSO	E ₂ 17βG Sodium Salt (MW: 470.49) を DMSO で溶解し、0.6 mM 溶液にする。	3 μM
BSEP	0.4 mM TCA in DMSO	TCA Sodium Salt Hydrate (MW : 537.68) を DMSO で溶解し、0.4 mM 溶液にする。	2 μM

5. アッセイ手順

以下は、基質化合物の ATP 依存的な輸送量を測定するための標準的な手順です。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 (HEK) を以下の通りに混合し、氷上で反应用チューブに 20 μL ずつ分注する。

<ベシクル溶液>	(1 反応あたり)	(8 反応分として)
ABC Transporter Vesicle Products (HEK) (5 mg/mL)	10 μL	80 μL
Buffer A	10 μL	80 μL
	(Total 20 μL/assay)	(Total 160 μL)

- (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)	(4 反応分として)
Reagent C あるいは D	20 μL	80 μL
基質化合物溶液	0.25 μL	1 μL
Reagent G (試験によっては Buffer A)	0.5 μL	2 μL
Buffer A	9.25 μL	37 μL
	(Total 30 μL/assay)	(Total 120 μL)

◆ 阻害試験を行う場合は、目的に応じて被験化合物 (阻害剤) を (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 μL に合わせます。

- (3) 内部標準物質を含んだ溶出液 (80 % アセトニトリルなど) で基質化合物の標準曲線希釈系列を作製する。
- (4) 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 °C で 5 分間プレインキュベーションする。
- (5) 20 μL 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 μL 加えて混合し、反応を開始する。

- (6) 反作用チューブを 37 °C でインキュベーションする。反応時間は ABC Transporter Vesicle Products (HEK) 製品の各製品データシートを参考にする。
- (7) 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。
- (8) 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プレートで吸引ろ過する。
 - 8-1) 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、吸引を開始する。
 - 8-2) 標準曲線希釈系列用のウェルに、50 μ g/well 相当のベシクル膜をフィルタープレートに添加し、吸引ろ過する。
 - 8-3) マルチチャンネルピペットを用い、反応液をフィルタープレートに移し、吸引ろ過する。
 - 8-4) フィルターを氷冷した Buffer B で 200 μ L/well \times 5 回洗浄する。
- * 良好な結果を得るために(7)から(8)の操作を素早く行ってください。
- (9) 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。

◆フィルタープレートの下部が濡れていると、(11), (12) で行う溶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。

- (10) 96 ウェルプレート (遠心除水用) の上にフィルタープレートを重ね、550 \times g で 1 分間遠心し、ウェル内に残っている溶液を除去する。
- (11) LC-MS 測定用の 96 ウェルディープウェルプレートにフィルタープレートを重ねる。
- (12) フィルタープレートの各ウェルに 50 μ L の内部標準物質を含んだ溶出液を加える。並行して 8-2) で準備した標準曲線希釈系列用のウェルに、(3) で準備した各濃度に対応する溶液をそれぞれ 50 μ L 添加する。
- (13) フィルタープレートをディープウェルプレートに重ねたまま 550 \times g で 2 分間遠心し、可溶化したベシクル溶液をディープウェルプレートに集める。
- (14) (12) と (13) を繰り返す。
- (15) 適宜水系移動相で希釈し、LC-MS で測定する。

6. データ解析

- (1) 各フィルターに存在する基質量 (pmol) を以下の式を用いて計算する。

$$\begin{array}{l} \text{各フィルターに存在} \\ \text{する基質量 (pmol)} \end{array} = \text{各フィルターの基質濃度 (\mu M)} \times \text{抽出液量 (\mu L)}$$

- (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 μ L, 1.0 μ m, glass fiber (#8031)
吸引ろ過装置	Millipore	MultiScreenHTS Vacuum Manifold
96 ウェルプレート	TFS	96-Well Microplate
96 ウェルディープウェルプレート	TFS	96-well deep well plate (2 mL)
96 ウェルキャップマット	TFS	96-Well Pre-Slit Microplate Cap Mat

7.2. 非標識化合物基質

– Estradiol 17-(β -D-glucuronide) sodium salt

MW	470.49
分子式	$C_{24}H_{31}O_8Na$
メーカー名	Sigma, E1127 など

– Taurocholic acid sodium salt hydrate

MW	537.68 (anhydrous basis)
分子式	$C_{26}H_{44}NNaO_7S \cdot xH_2O$
メーカー名	Sigma, T4009 など

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)



〒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