

いまさら聞けない トランスポーターの基礎 - 入門編 -

第5回 Vesicular assay について

株式会社ジェノメンブレン

なぜベシクルアッセイをするのか？

Vesicular Transport Assay >>> 膜小胞輸送アッセイ

ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter family

○ATP加水分解活性を有する膜タンパク質

> 生理活性物質の輸送・生体異物排泄による生体防御

○約 10 種類が細胞内から細胞外へ薬剤を排出

> 薬物投与時の薬物動態

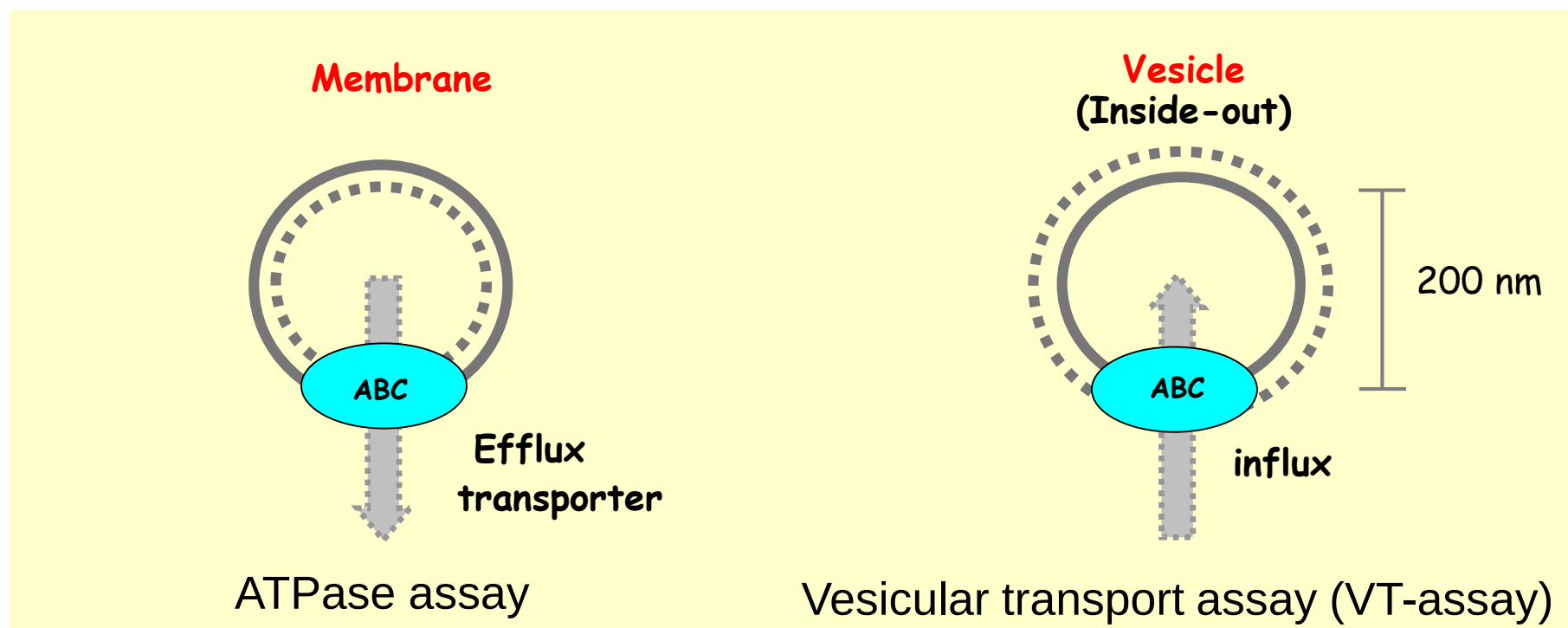
> 毒性(消化管吸収性、腎・肝排泄など)

*in vitro*で開発候補化合物の薬物動態および毒性リスク要因を予測
直接薬物の輸送を評価可能であり簡便なトランスポーター解析技術

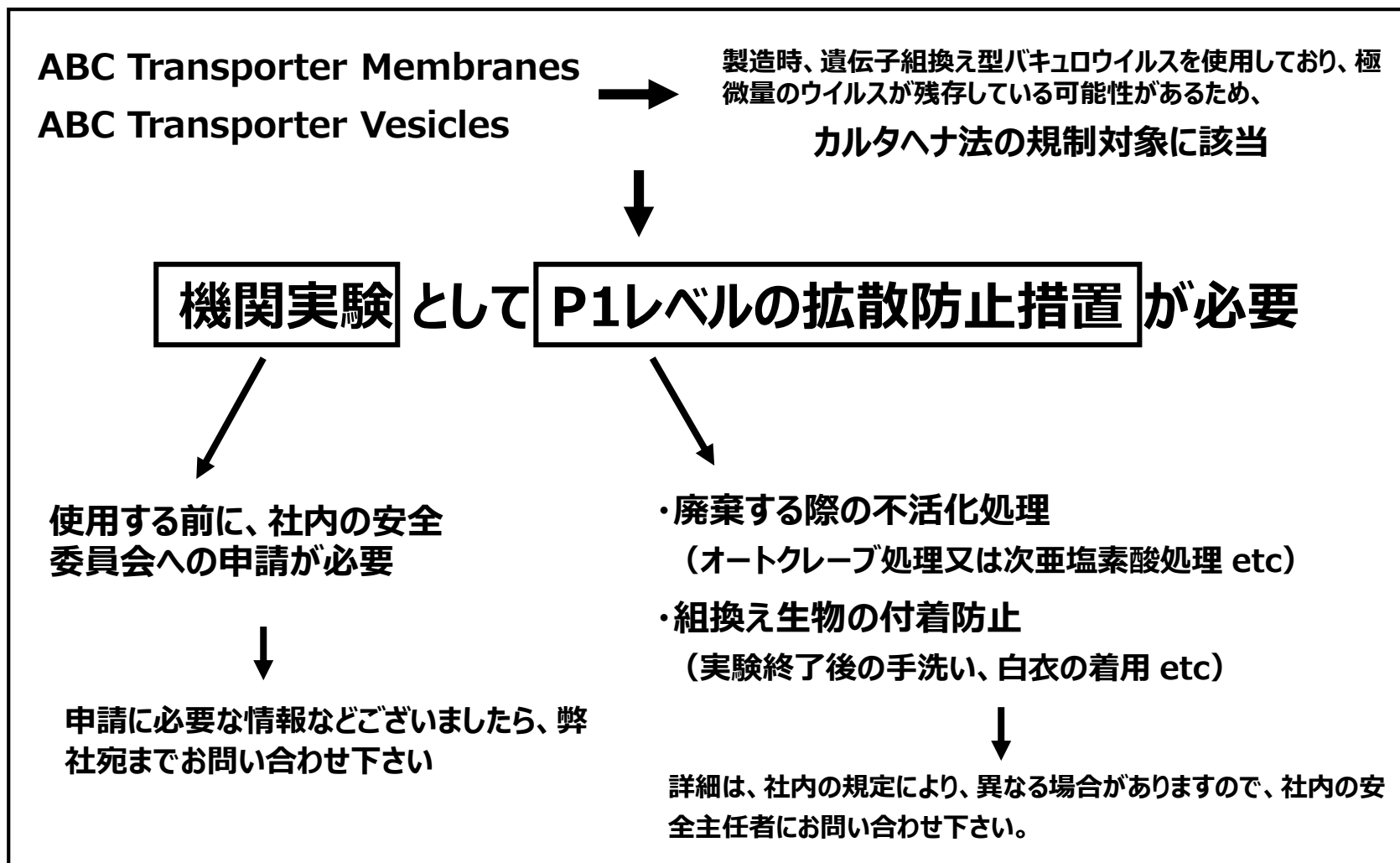
ベシクルとは？

ABCトランスポーターを大量発現させた反転膜小胞

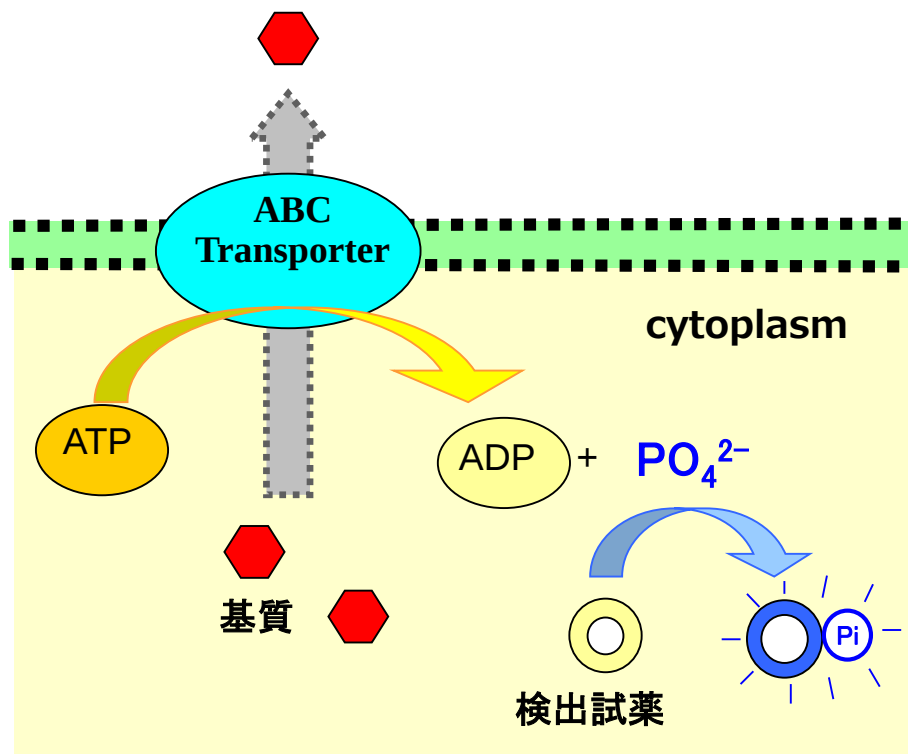
- ◇ 細胞（Sf9、HEK293）から精製した膜画分
- ◇ ABCトランスポーター由来のATP加水分解活性を維持



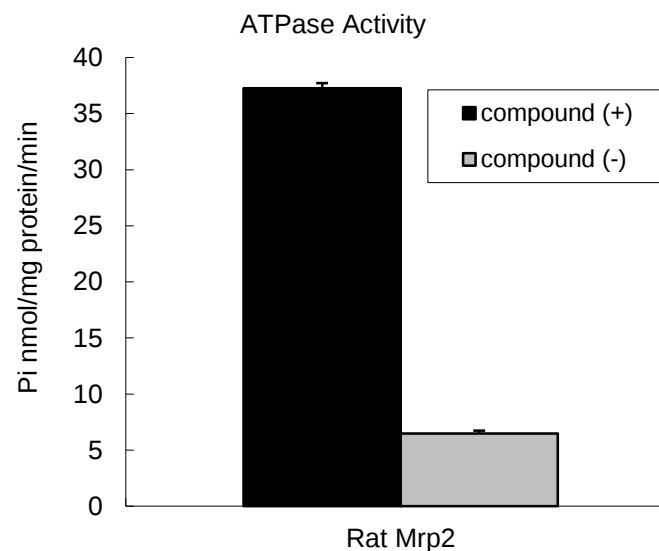
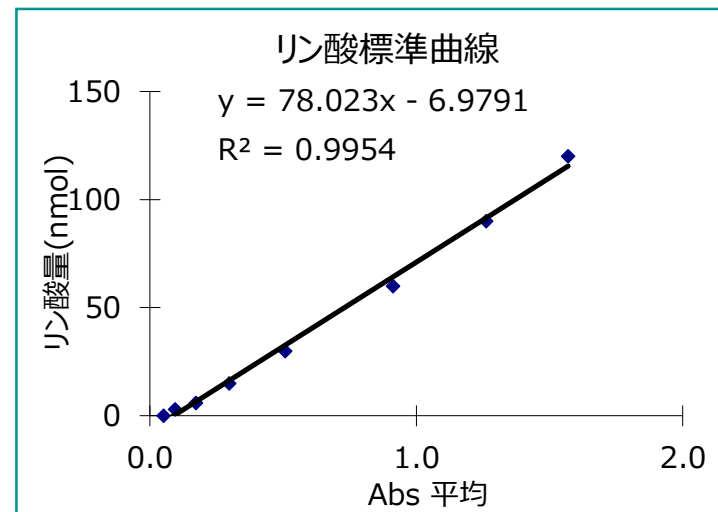
Sf9 Membrane, Vesicle 使用上の注意



アッセイの原理 (ATPase Assay)



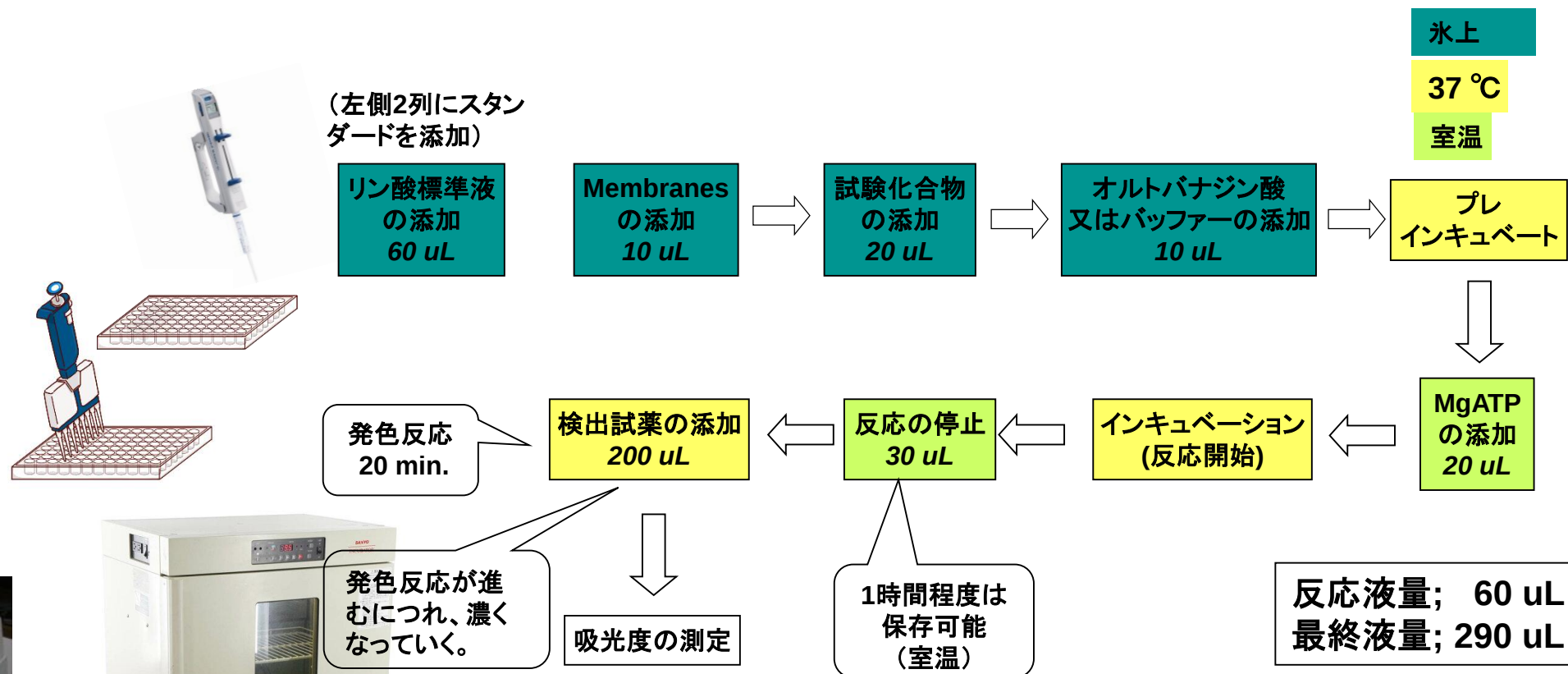
生じた無機リン酸量を検出試薬を用いて
発色後、吸光度を測定



化合物存在下と非存在下
の比較

間接的な方法

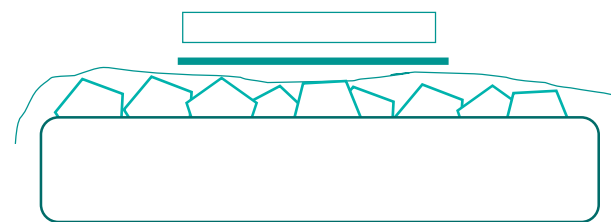
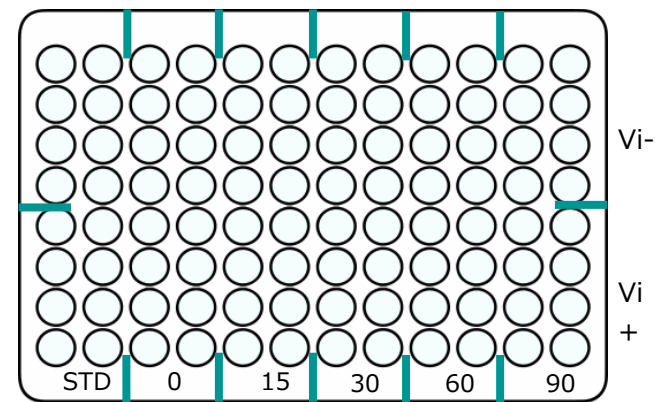
実験の流れ (ATPase assay)



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0 nmol	0 nmol	50uM Verapamil	no compound control (DMSO)									-Vi
B	3 nmol	3 nmol											
C	6 nmol	6 nmol											
D	15 nmol	15 nmol											
E	30 nmol	30 nmol	50uM Verapamil	no compound control (DMSO)									+Vi
F	60 nmol	60 nmol											
G	90 nmol	90 nmol											
H	120 nmol	120 nmol											
	Pi standard												

ポイント・注意点

- ◆ 有機溶媒 (終濃度 ; DMSO 2%, MeOH, EtOH, Acetonitrile 1%を推奨)
- ◆ プレートの設置
- ◆ プレートに印
- ◆ ウェル内左右の壁
- ◆ ベシクルの融解方法
- ◆ 反応はウォーターバス、
発色反応はインキュベータ
- ◆ 発色液添加時、チップの先端



- ← プレート
- ← 鉄板
- ← アルミホイル
- ← アイスボックス

平らにして安定
・分注しやすい、わかりやすい

FAQ・トラブルシューティング

- ◆ カルタヘナ法の規制対象に該当(Sf9 vesicles)
- ◆ 製品1本のアッセイ量
- ◆ 保存温度

- ◆ ATPがデータシート通りにならない
 - 自社調製の場合、ATPのメーカー変更
 - 膜融解回数、融解から再凍結時間の再確認
 - 発色液 アスコルビン酸調製時のpH 確認

Reaction solution

50 mM	MOPS-Tris (pH7.0)
0.1 mM	EGTA
2 mM	DTT
50 mM	KCl
5 mM	Na-azide

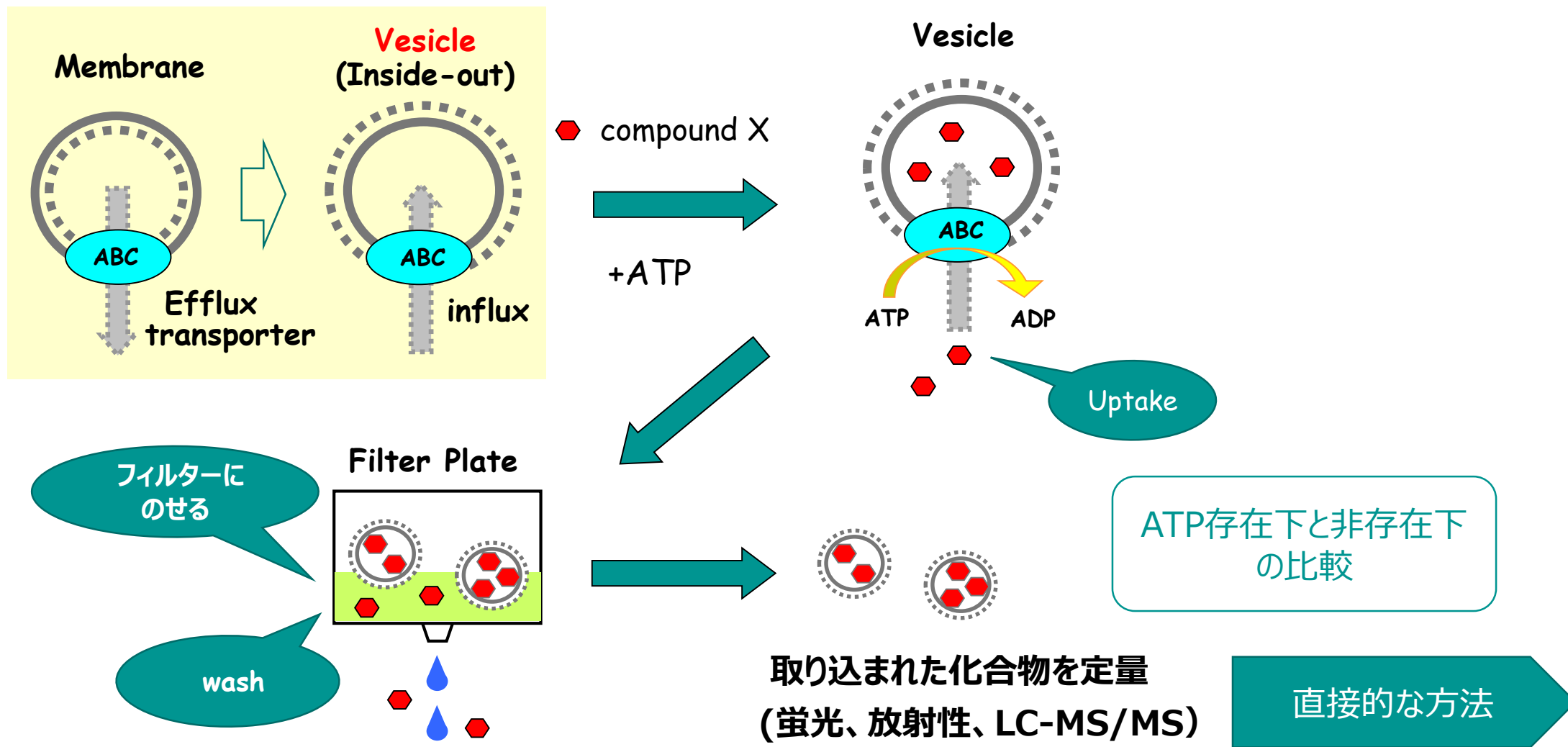
Reaction = volume 60 ul

10 ug	MDR1membrane
0 or 500 uM	vanadate
0 or 50 uM	verapamil
4 mM	MgATP
In reaction solution	

検出液

35 mM モリブデン酸アンモニウム
- 15 mM 酢酸亜鉛
:
10%アスコルビン酸(pH 5)
= 1 : 4

アッセイの原理 (Vesicular Transport Assay)

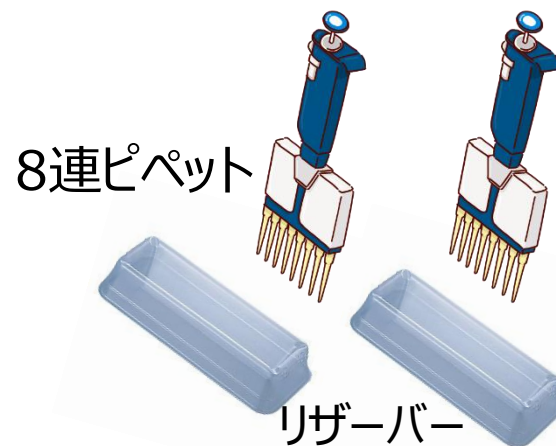


必要な機器および資材



8連チューブ

96穴フィルタープレート
を用いた試験に対応し
やすい



8連ピペット

リザーバー



チューブの温度を一定
(37℃及び0℃)に
保つために使用

アイストラック®

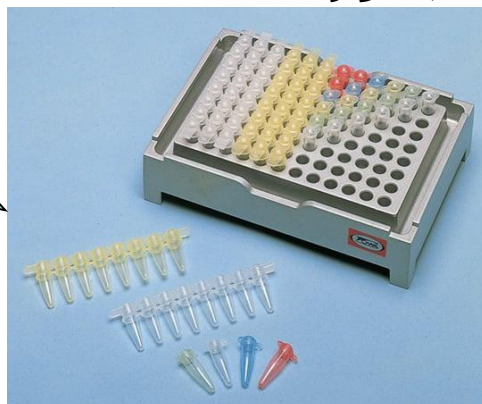


写真) アズワン HPより引用



恒温槽

写真) タイテック HPより引用



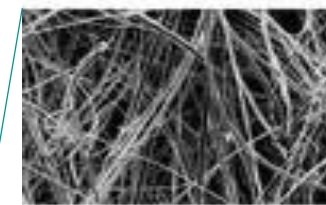
V well

フィルタープレート
Pall # 8031
pore size 1.0 μm



マニホールド

写真) Merck 社HPより引用



廃液吸引ユニット

※画像は代表画像でイメージです

RIで使用

Filter Plate

Millipore, MSFBNXB



+

Disposable Punch Tips

MADP 19650

Multiple Punch

Millipore, MAMP 096 08

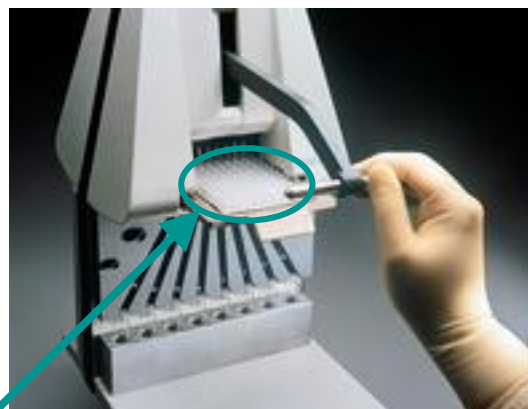


写真) Millipore 社HPより引用



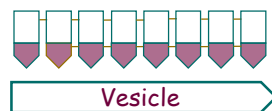
コルクポーター
穴開け径 4.0

実験の流れ (VT-assay)

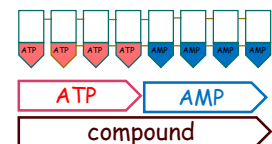
ベシクルと
化合物 および ATP/AMP

(1) 準備

Tube A



Tube B



(2) プレインキュベート (3) 混合・反応



(4) 反応停止

氷冷バッファーを添加



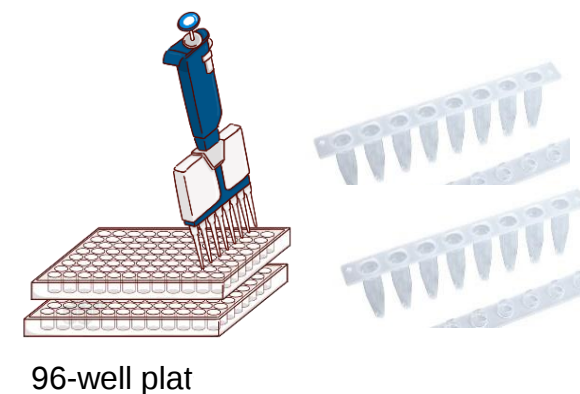
(7) 測定



(6) 遠心回収



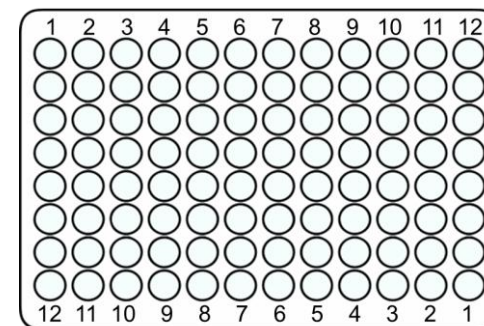
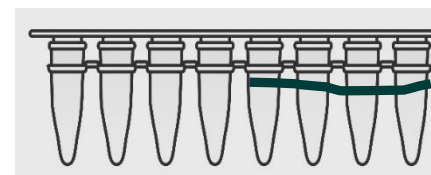
(5) フィルタープレートにのせ、洗浄



ポイント・注意点

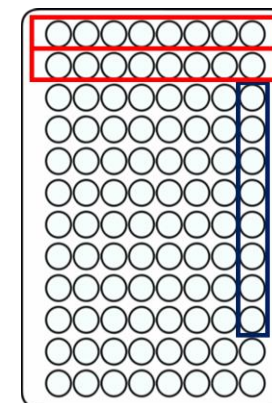
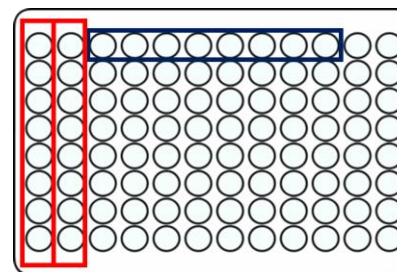
準備

- ◆ 有機溶媒 (終濃度 DMSO 0.5%, MeOH, EtOH, Acetonitrile 1%を推奨)
- ◆ タイムテーブル作成
- ◆ 8連チューブに印 (ATP 添加する側面だけに印)
- ◆ アイス・ラックに番号を
- ◆ 37°C, ウォーターバス内アイス・ラック穴にも水
- ◆ ベシクルの融解方法
- ◆ ピペットはリバーズ法で操作



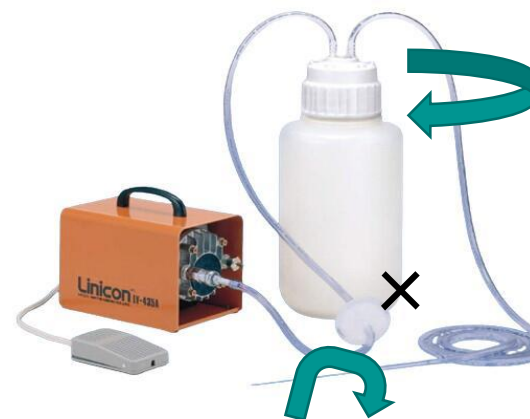
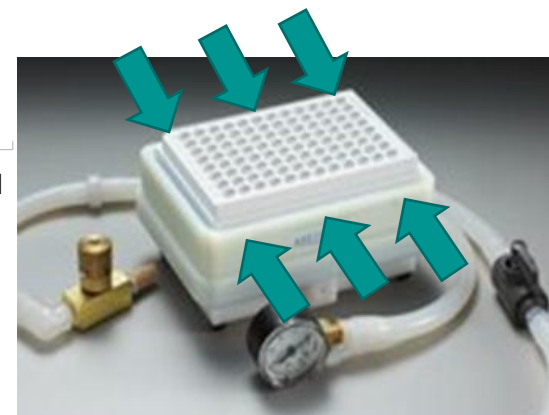
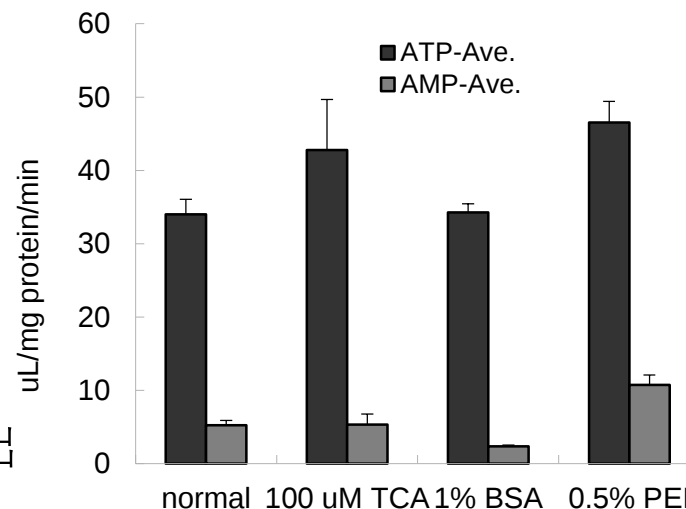
反応～吸引

- ◆ 8連ピペットにチップ装着
- ◆ 反応後反応液の氷上静置時間
- ◆ フィルタープレートへの添加前のプレウェット操作



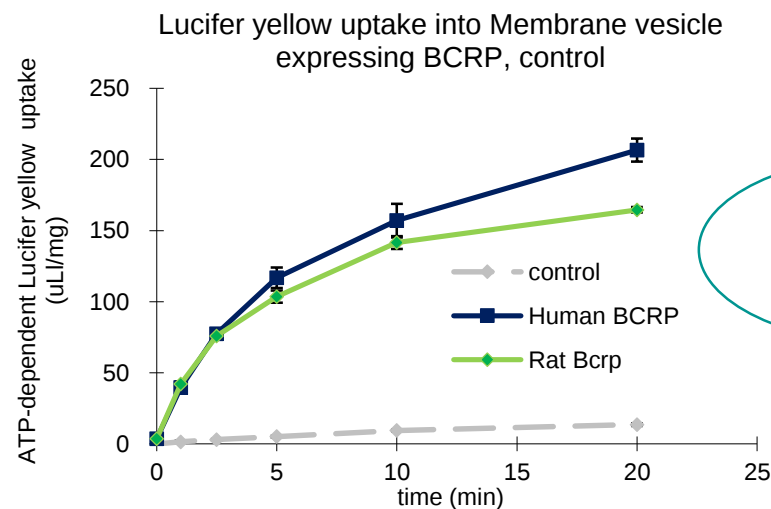
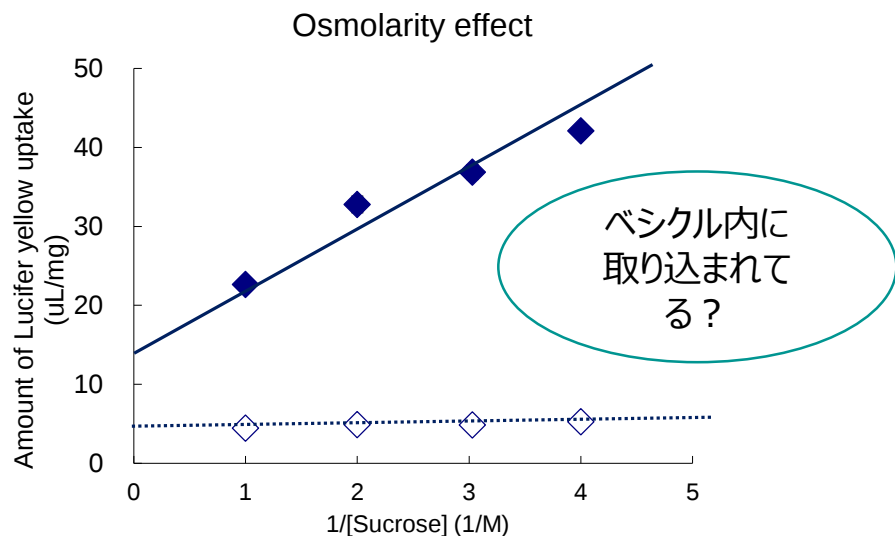
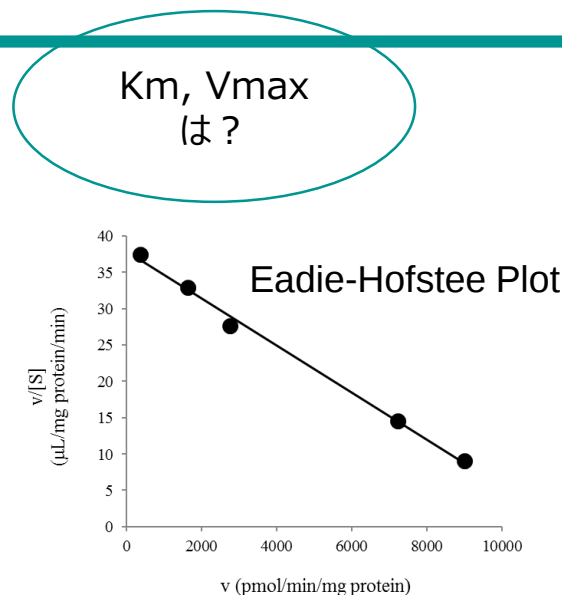
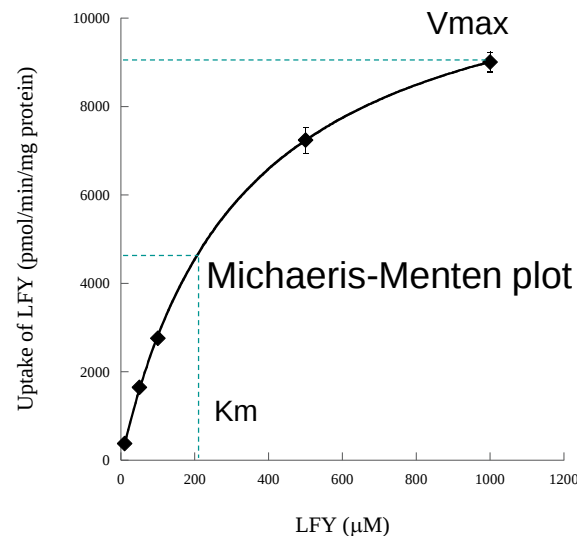
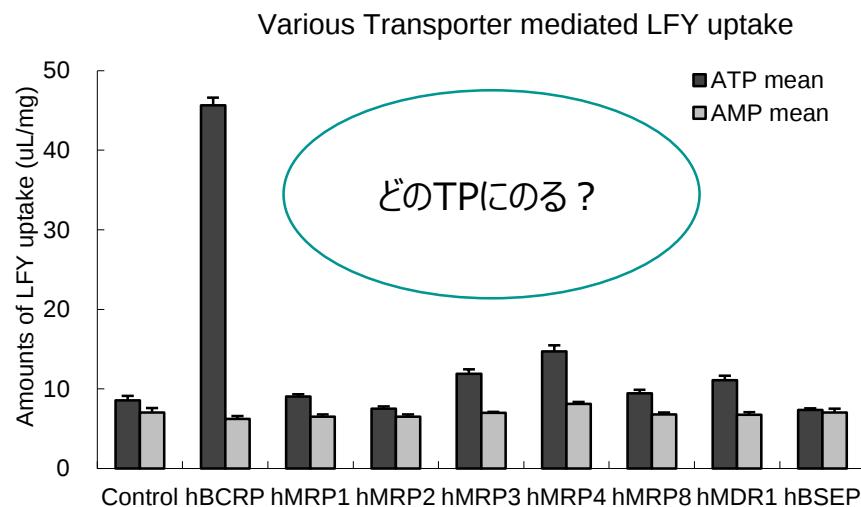
FAQ・トラブルシューティング

- ◆ カルタヘナ法の規制対象に該当(Sf9 vesicles)
- ◆ 製品1本のアッセイ量
- ◆ Reagent Kitの量
- ◆ 保存温度
- ◆ 化合物の脂溶性が高く、膜への吸着が心配
- ◆ ATP存在下での取り込みがデータシート通りにならない
 - 自社調製の場合、ATPのメーカー変更
 - 膜融解回数、融解から再凍結時間の再確認
- ◆ マニホールドの真空が始まらない
 - 廃液ボトルの蓋の緩み、マニホールド枠の歪み、フィルターのかみり



※画像は代表画像でイメージです

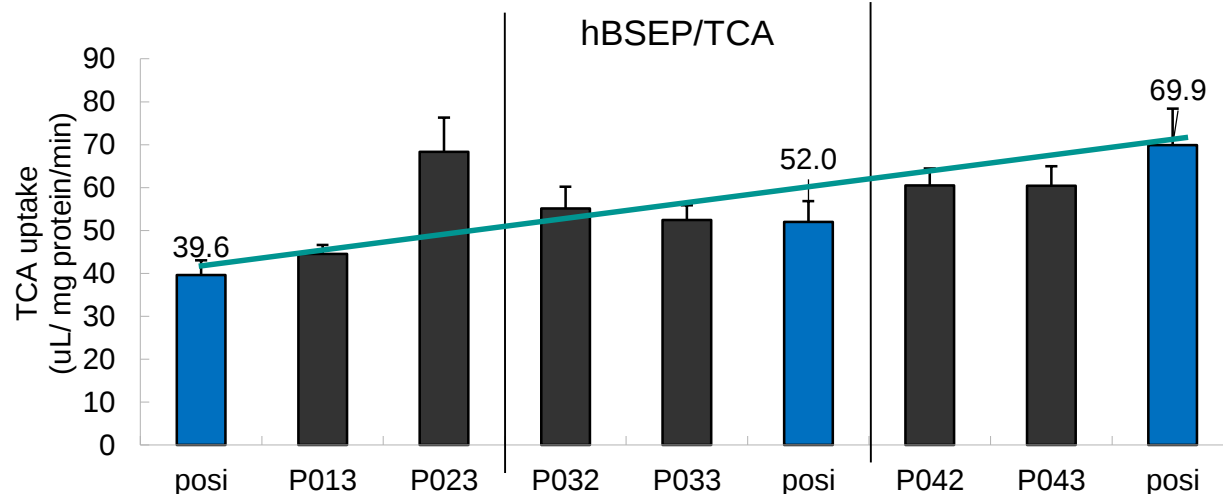
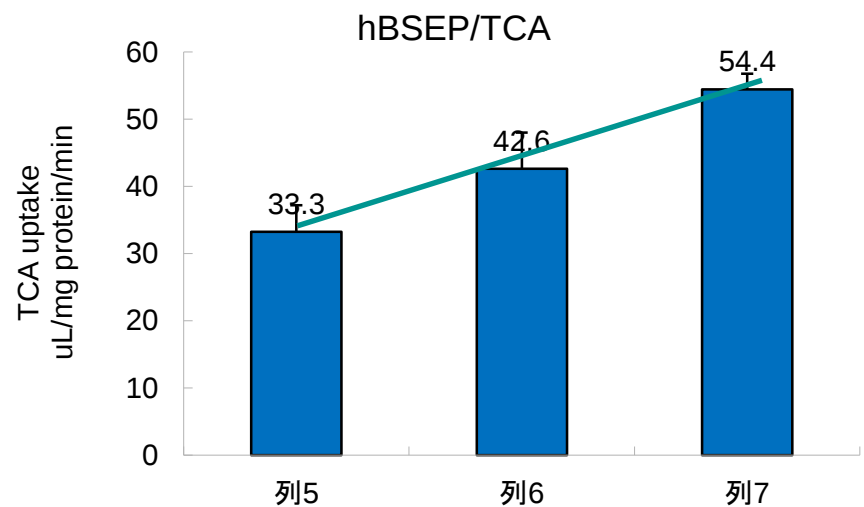
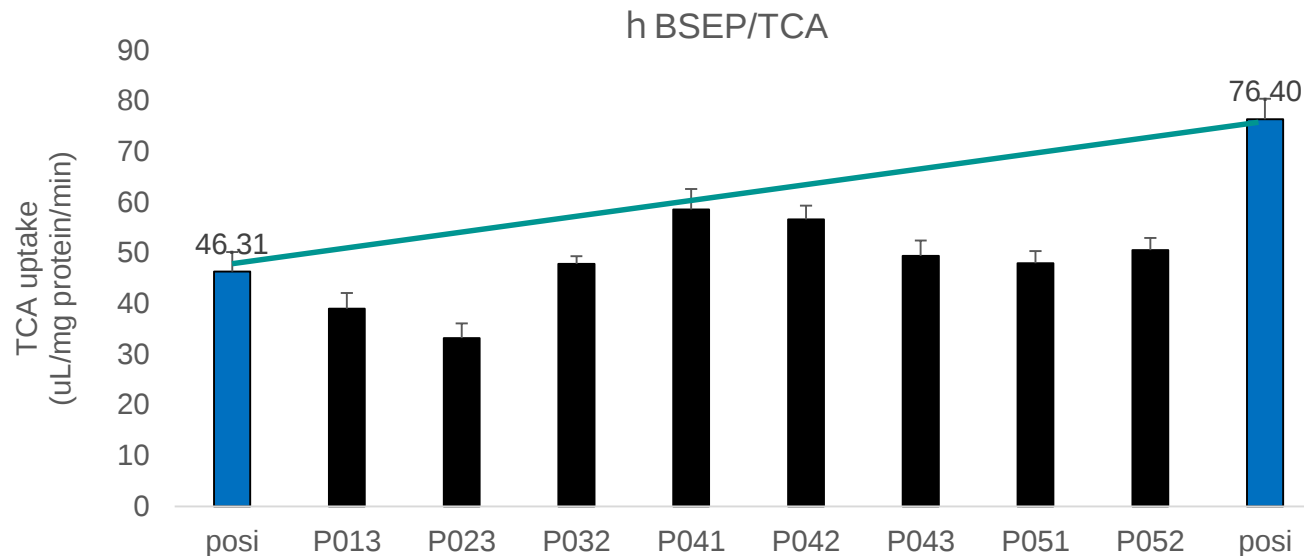
アッセイのいろいろ



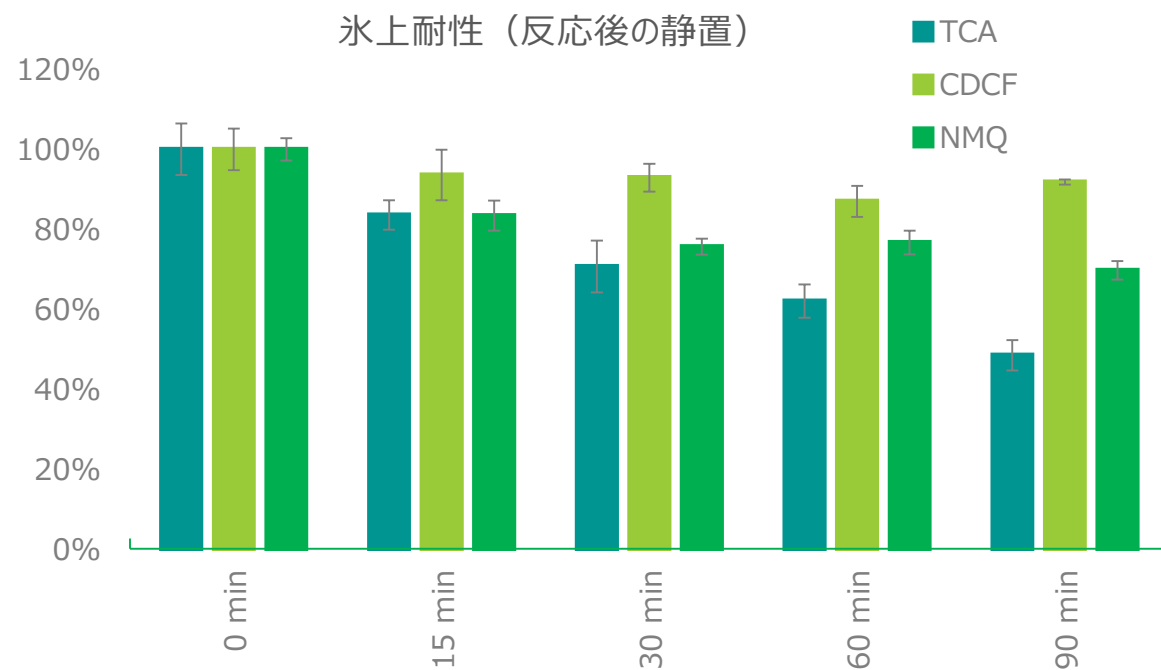
時間依存的？

TCAを使用したアッセイについて

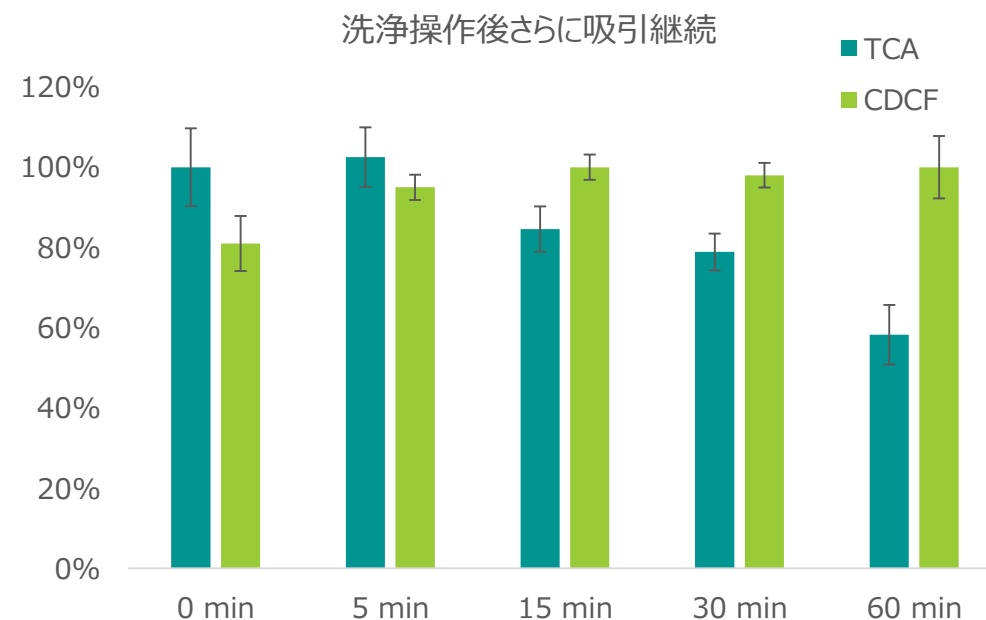
tube No.	pre	start	stop	reaction time
1	0	5	7.5	2.5
2	0.5	5.5	8	2.5
3	1	6	8.5	2.5



反応液の氷上耐性・吸引継続検討



反応終了後はなるべく早くフィルターへ



吸引洗浄後はなるべく早く溶出へ

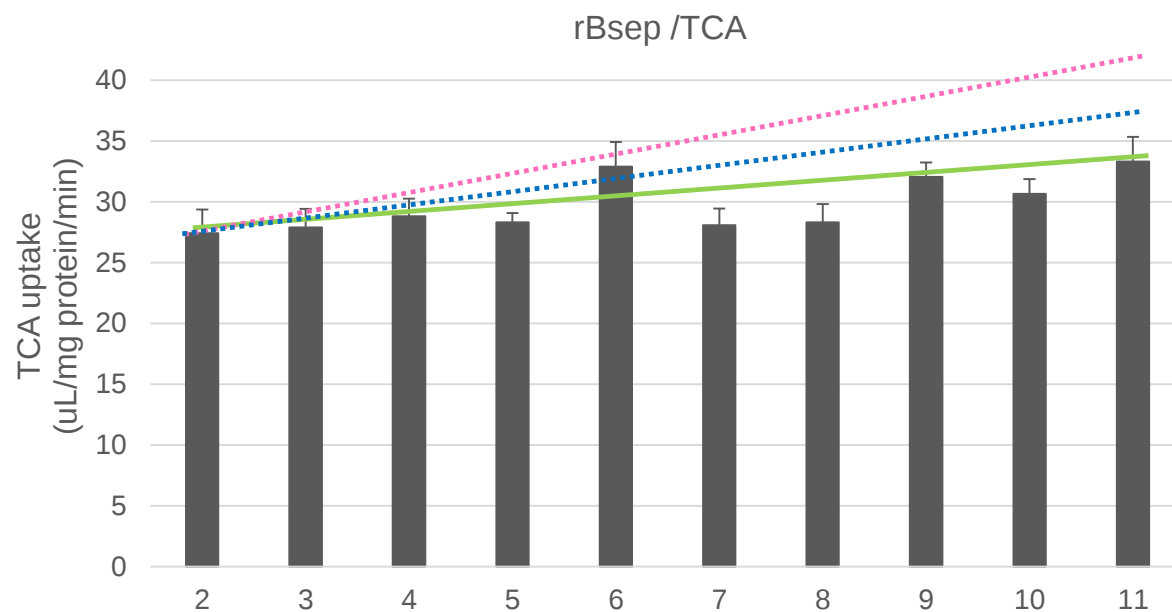
TCAを用いたVT-assayの改善案

TCA調製日別タイムテーブル【例：10列】

*列数は適宜変更可

tube No.	pre	start	stop	reaction time	
1	0:00	5:00	7:30	2:30	posi1
2	0:15	5:15	7:45	2:30	
3	0:30	5:30	8:00	2:30	
4	0:45	5:45	8:15	2:30	
5	1:00	6:00	8:30	2:30	
6	1:15	6:15	8:45	2:30	
7	1:30	6:30	9:00	2:30	
8	1:45	6:45	9:15	2:30	
9	2:00	7:00	9:30	2:30	
10	2:15	7:15	9:45	2:30	posi2

初期：30秒間隔から15秒間隔へ



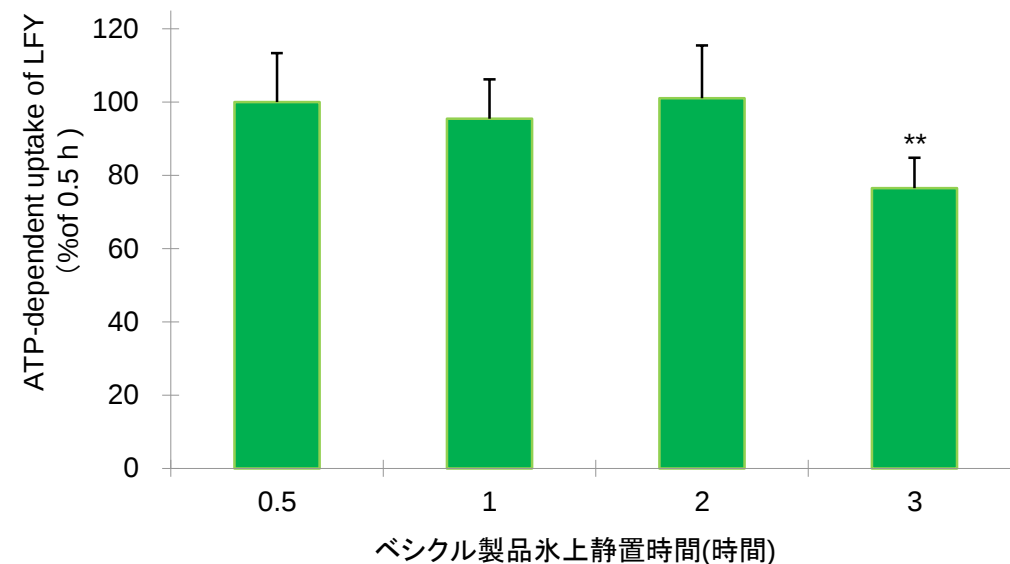
参考資料

タイムテーブル 例

tube No.	pre	start	stop	reaction time	
1	0	5	15	10	posi1
2	4.5	9.5	14.5	5	
3	6	11	12	1	
4	6.5	11.5	14	2.5	
5	7.5	12.5	13	0.5	
6	10.5	15.5	16.5	1	posi2
7	13.5	18.5	19.5	1	

調整して 近くする

LFY uptake into Membrane vesicle expressing Human BCRP



製品使用後はすぐ凍結

いまさら聞けない トランスポーターの基礎 － 入門編 －

第5回 Vesicular assay について

ご清聴ありがとうございました

株式会社ジェノメンブレン