

Luminescence 측정을 위한 Berthold Luminometer 시리즈

다카라코리아에서는 다양한 실험에 적용되고 있는 luminescence를 측정하기 위한 Berthold Detection System의 luminometer를 판매하고 있다. 필요에 따라 Tube type, plate type을 선택할 수 있으며, injector 기능을 옵션으로 하고 있어 원하는 사양을 자유롭게 선택할 수 있다.

표 1. Berthold luminometer 시리즈



FB12 Tube Luminometer

The Gold Standard for Glow Luminescence

- Ultrasensitive Photon Counting Detector
- Total Flexibility in Sample Format
- Standalone Operation or PC Operation



Sirius Tube Luminometer

Highest Performance and Flexibility same features as FB12, PLUS:

- Built-in Printer
- Up to Two Automated Reagent Injectors
- Safe Operation through Sample Presence Detection



Orion L Microplate Luminometer

All You Need for Luminescence Measurement

- Ultrasensitive Photon Counting Detector
- Up to Two Automated Reagent Injectors
- Sophisticated PC Software



Orion II Microplate Luminometer

The Top Instrument in the Field same features as Orion L, PLUS:

- Up to Four Automatic Reagent Injectors
- Two Temperature Control Options
- And Many More Powerful Functions

Luminometer를 이용한 실험예

Bio- and Chemiluminescence 기술은 임상 진단, 기초 연구, 약물 개발, 반응 측정, 환경적인 측정 등과 같은 여러 분야에서 사용되고 있다. 가장 많이 알려져 있는 적용방법 중 몇 가지 사항에 대해 아래에 기술하고자 한다.

Reporter Gene Assays

리포터 유전자는 살아 있는 세포들에 유전자 발현과 조절 기작 연구에 광범위하게 사용되고 있다. 발현된 효소가 모두 쉽게 검출할 수 있는 것은 아니다. 때문에 cellular DNA로 리포터 유전자의 발현을 유도하고, 측정가능한 발광물질을 처리하여 유전자 기능을 알 수 있도록 해준다. 이러한 리포터 유전자는 개뿔벌레 루시퍼레이즈(firefly luciferase), β -galactosidase, alkaline phosphatase, β -glucuronidase, β -glucosidase등이 있다. 가장 많이 알려진 리포터 유전자는 american firefly (*Photinus pyralis*)에서 추출한 개뿔벌레 luciferase 이다. 높은 감도, 쉬운 조작, 짧은 반응 시간과 bioluminescence 반응에서 높은 반응성이 유전자 기능을 이해하기 위한 이 기법이 "선택의 방법"을 제시해 준다.

ATP Assays

개뿔벌레 luciferase (*Photinus pyralis*)의 촉매반응을 이용한 ATP assay는 과학과 산업 연구 전반에 중요한 분석 도구로 사용된다. 모든 살아 있는 세포 내의 ATP의 존재가 다양한 application에 기초가 되고 지난 몇 년 동안 수많은 관련 논문이 발간되었다.

- * 위생학(Hygiene)과 불임 모니터링(free and microbial ATP)에 사용되는 Assay
- * ATP와 연계된 효소와 대사 산물 탐색
- * 항생물질의 감수성 검사
- * 중앙의 화학적 민감성 연구
- * 독성 검사
- * 세포 증식 검사
- * 세포 사멸 연구
- * 소변 계통 감염 검사
- * 이외의 다양한 검사

세포배양시 mycoplasma 감염

세포 배양중 Mycoplasma의 오염이 빈번하게 발생되었지만 종종 검출하지 못하는 경우가 있다. 하지만 이러한 감염은 cellular process의 변화를 가져올 수도 있고, 최악의 경우 세포의 성장을 저해하고 결과적으로 배양의 손실을 초래할 수 있다. Human, bovine, porcine 으로부터 유래한 mycoplasma는 *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma arginini*, *M. fermentas*, *M. hominis*, *M. hyorhinitis*, *M. orale*그룹과 더불어 가장 널리 사용하고 있다. Mycoplasma (R) Assay는 luminescent assay로 mycoplasma의 오염을 쉽고 빠르면서 확실하게 검출해 낸다.

이밖에도 동위원소 라벨을 대체하여 chemiluminescence 라벨을 사용하는 정량적 검출방법인 Chemiluminescence Immunoassay (CLIA), 세포내 산화, 환원과정을 측정하는 ROS 측정실험, Endotoxin Activity Assay 등에 luminometer를 이용할 수 있다.

* 본 고에서는 Berthold의 luminometer를 이용한 많은 실험 중, 가장 널리 사용되고 있는 샘플의 mycoplasma 감염여부를 측정한 실험 예를 소개한다.

Orion II Microplate Luminometer (Berthold)를 이용한 mycoplasma 검출 실험

시약 : MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit (Lonza)

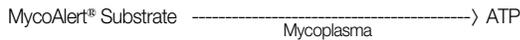


그림 1. Berthold Orion II microplate luminometer와 Lonza MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit

Mycoplasma는 가장 작고 간단한 원핵생물체로 생합성 능력이 매우 제한적이어서 대부분 숙주의 영양물질에 의존하여 살아간다. Mycoplasma에 오염되어도 배양액의 pH나 혼탁정도에 영향을 미치지 않기 때문에 세포배양시 이를 발견하기란 매우 어렵다. 하지만 눈에 확연하게 보이지 않는 이러한 감염으로 인해 감염 세포의 형태, 생존 능력, 대사작용에 변화를 가져올 수도 있다.

Lonza의 MycoAlert® assay는 mycoplasma에서 유래한 효소의 활성을 이용한 선택적인 생화학 테스트로, 샘플의 mycoplasma 감염여부를 높은 감도로 빠르게 스크리닝할 수 있다. 살아있는 mycoplasma로부터 유래한 효소가 MycoAlert® 기질과 함께 ADP를 ATP로 전환하는 반응을 촉매하므로, MycoAlert® 기질을 첨가하기 전과 후에 샘플의 ATP 수준을 측정하여 mycoplasma의 감염 여부를 판단한다. 만약 샘플에 mycoplasma 유래 효소가 없다면 첨가 전 측정값과 첨가 후 측정값의 변화가 없을 것이다. 반면 효소가 MycoAlert® 기질과 반응했다면 ATP 수준이 증가하게 될 것이다.

■ 반응



방출되는 빛의 강도와 mycoplasma 효소의 농도간에 직선적인 상관관계가 있다.

■ 실험방법

주의 : 반드시 샘플 배양액을 원심분리 하여 세포를 모두 제거한 후 상층액만 실험에 이용해야 한다.

100ul 의 배양 상층액을 준비한다 (1시료당 3개의 반응액 준비).

100ul의 MycoAlert® Reagent (MycoAlert® buffer로 미리 녹임)를 첨가하여 실온에서 5분간 둔다.

Plate를 Orion II에 넣고 1초간 측정한다 (READ A).

100ul의 MycoAlert® Substrate (MycoAlert® buffer로 미리 녹임)를 첨가하고 다시 실온에서 10분간 반응한다.

Plate를 Orion II에 넣고 1초간 측정한다 (READ B).

MycoAlert® 비율 = READ B / READ A

산출된 값이 1을 넘지 않으면 mycoplasma에 감염되지 않은 것이고, 값이 1을 넘으면 mycoplasma에 감염된 것으로 판정한다.

[실험예 1]

MycoAlert® Control을 단계적으로 희석한 후 3반복으로 mycoplasma를 검출하여 본 assay의 감도와 luminometer와의 상관성을 확인하였다.

Investigating the sensitivity of the Orion II using MycoAlert Control

Av Ratio MAB

Expon. (Av Ratio MAB)

Dilutions of MycoAlert Control

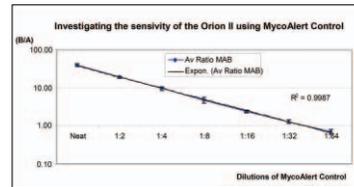


그림 2. Investigating the sensitivity of the Orion II microplate reader for use with MycoAlert® Mycoplasma Detection Assay.

[결과 1]

MycoAlert® positive control을 단계적으로 희석하여 측정된 READ B/ READ A 값을 그래프로 작성한 결과, Orion II microplate luminometer를 이용하여 매우 뛰어난 감도로 mycoplasma를 검출할 수 있음을 확인하였다.

[실험예 2]

U937 (human lymphoma)와 K562 (human myeloid leukaemia) 세포에 2가지 strain의 bovine mycoplasma (*M. bovis*와 *M. bovirhinis*)를 감염시켜 실험하였다.

실험은 위에 서술된 방법에 따라 진행하였고, 순차적으로 희석한 샘플을 3반복으로 측정하였다.

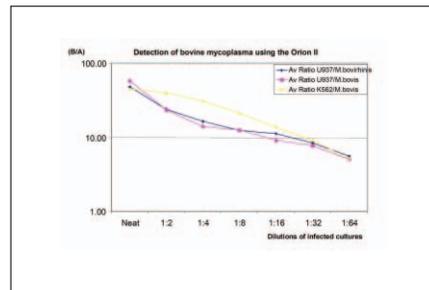


그림 3. The detection of Bovine mycoplasma using the Orion II, Average R2 values > 0,98

[결과 2]

실험결과인 READ B/ READ A 값을 그래프로 작성한 결과, Orion II microplate luminometer와 MycoAlert® Mycoplasma detection Assay를 이용하여 매우 뛰어난 감도로 mycoplasma를 검출할 수 있음을 확인하였다.

■ 관련제품군

| 제품명 | TaKaRa Code | Size |
|--|-------------|-----------|
| MycoAlert Mycoplasma Detection Kit | LT07-118 | 10 tests |
| | LT07-218 | 25 tests |
| | LT07-318 | 100 tests |
| | LT07-418 | 50 tests |
| Ready-To-Glow Secreted Luciferase Reporter Assay | 631726 | 100 rxn |
| | 631727 | 500 rxn |
| | 631728 | 1,000 rxn |
| Ready-To-Glow Secreted Luciferase pMetLuc Vector Kit | 631729 | 1 Kit |
| | | |
| Ready-To-Glow Secreted Luciferase Reporter System | 631730 | 100 rxn |
| | 631731 | 500 rxn |
| | 631732 | 1,000 rxn |
| Ready-To-Glow Dual Secreted Reporter Assay | 631734 | 500 rxns |
| Ready-To-Glow Dual Secreted Reporter Vector Kit | 631735 | 4 X 20 ug |