

OCR および ECAR: リアルタイムの 細胞生体エネルギー学のための新しい アプリケーション

一体型ガラス pH 電極を備えた Oxytherm+R
および Oxygraph+ プラットフォームを使用した
OCR と ECAR の同時測定



はじめに

ダリオ・ロフルメント博士およびエリオ・ロフルメント教授(イタリア、サレント大学)と共同で新しい方法論が開発され、Hansatech社のOxytherm+RおよびOxygraph+測定システムの機能が拡張されました。この新しいアプローチにより、同じ実験内でpH変化を定量的な細胞外酸化速度(ECAR)とプロトン産生速度に変換するシンプルなツールを使用して、酸素消費速度(OCR)と細胞外pHフラックスの両方を直接リアルタイムで測定できます。

蛍光ベースのプラットフォームに代わる直接的で信頼性の高い代替品

蛍光ベースのOCR/ECARワークフローとは異なり、Oxytherm+RおよびOxygraph+をpH電極とともに使用すると、蛍光プローブ、事前にプログラムされた厳密な注入シーケンス、および滴定の多いポストアッセイ変換ワークフローが回避されます。代わりに、複合システムでは次のセンサーが使用されます。



- 酸素消費量を直接測定するための高感度Hansatech社酸素電極
- 細胞外酸化を直接測定するためのガラスpH電極、この研究ではHach Sension+ 5208 pH微小電極



これにより、研究者は細胞の代謝応答をリアルタイムで連続的に観察することが可能となり、化合物を動的に添加したり、分析中に安定した測定間隔を選択したり、処理工程を最小限に抑えてOCR/ECAR反応を直接解釈したりできるなど、より柔軟な実験アプローチが可能になります。Oxytherm+RおよびOxygraph+は、専用アッセイマイクロプレートやセンサーカートリッジを必要とする蛍光ベースのシステムと比較して、初期導入コストおよび継続的な運用コストが大幅に低減されます。その結果、ミトコンドリア機能、解糖活性、代謝ストレス、および細胞のエネルギー効率を調査するための、実用的で適応性の高いプラットフォームが実現します。

蛍光ベースのプラットフォームと比較した主な利点の概要

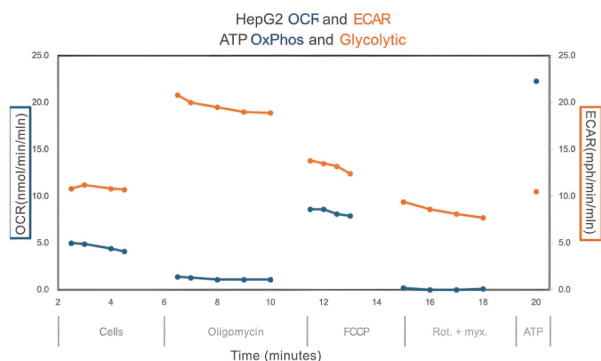
- リアルタイムの実験制御: アッセイ全体にわたって代謝活性が確認できるため、研究者は化合物をいつ追加するか、測定を延長するか、実験を停止するかを決定できます。
- 柔軟なアッセイ設計: 事前にプログラムされた固定の注入シーケンスに限定されるのではなく、アッセイ中に物質を動的に追加できます。

- **直接的かつリアルタイムな測定:** OCR(酸素消費速度)とpHフラックスをリアルタイムで直接測定するため、蛍光法による間接的な計算に依存する必要がなく、信号をOCRやECAR(細胞外酸性化速度)の値に変換するための煩雑な終点滴定の繰り返しも最小限に抑えられます。
- **ワークフローの簡素化とコスト低減:** 高価な消耗品や専用のアッセイ培地、さらには滴定を多用する追加の変換工程を必要としません。
- **包括的な生体エネルギー情報の取得:** 酸素と細胞外pHを同時に追跡することで、ミトコンドリア呼吸と酸性化の挙動をリアルタイムで並行してモニタリングできます。アッセイ終了後に行う個々のHCl滴定ステップの解析により、pH変化を定量的なECARおよびプロトン産生速度に変換することが可能です。

HepG2細胞で実証

この新しい方法論の開発において、古典的な生体エネルギー調節因子に対するHepG2細胞の応答を監視するために実験が行われました。

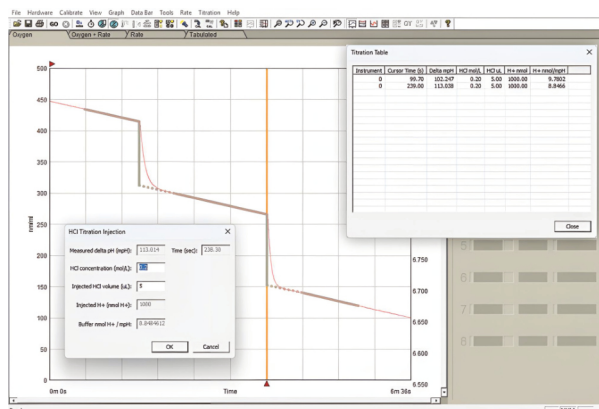
- **オリゴマイシン:** ATPシンターゼ阻害によりOCRが減少し、ECARが増加し、解糖系への代償的变化が示されました。
- **FCCP:** 刺激された酸素消費を切り離し、呼吸能力を明らかにします。
- **ロテノン+ミクソチアゾール:** 電子伝達鎖阻害によりOCRが大幅に減少する一方、残留 ECAR は解糖活性の継続を示しました。



イタリア、レッチェのサレント大学、Lofrumento DD からの実験データのグラフ

今後の展開

共同プロジェクトの重要な次のステップであり、将来の重要な利点は、解糖と酸化的リン酸化の両方からATP生成を推定できる可能性であり、OCRまたはECAR単独よりも細胞のエネルギー効率のより意味のある尺度を提供します。Oxytherm+RおよびOxygraph+システムに付属する独自のソフトウェアであるOxyTrace+内では、取得後分析ツールにより、ユーザー定義の時間間隔にわたる酸素とpHデータの両方からの変化率を自動計算できます。これは、ユーザーが信号データ内の安定した領域を自信を持って効率的に選択できることを意味し、以降の計算に正確なレート値を提供します。



OxyTrace+ HCl滴定分析機能

OCRおよびECARアッセイの場合、統合された滴定分析機能により、ECARからプロトン産生速度への変換が簡素化されます。この機能により、ユーザーは、ユーザー定義の容量と濃度のHClの滴定が実行されたpHグラフ上の正確な点を選択できます。OxyTrace+は、滴定後のデルタpHと緩衝能を正確な実験条件で自動的に計算します。複数のHCl滴定では、移動平均緩衝容量が計算されます。これにより、手動計算が減り、アッセイ間の一貫性が向上し、細胞外酸性化データをより確実に生物学的に意味のあるプロトン産生速度に変換できるようになります。