



10-04



Emerald Luc Luciferase Assay Reagent

(Code No. ELA-101)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department

OSAKA JAPAN

A3684K

—目次—

| | |
|---------------------------|---|
| [1] はじめに | 2 |
| [2] 製品内容 | 3 |
| [3] ご用意いただくもの | 3 |
| [4] 哺乳類細胞におけるアッセイ方法 | 4 |
| 1. 試薬の準備 | 4 |
| 2. アッセイ方法 | 4 |
| [5] 哺乳類細胞におけるアッセイの例 | 6 |
| [6] トラブルシューティング | 7 |
| [7] 関連商品 | 8 |

ご注意

本製品は研究用試薬です。診断・臨床用試薬として決して使用しないでください。本製品の使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

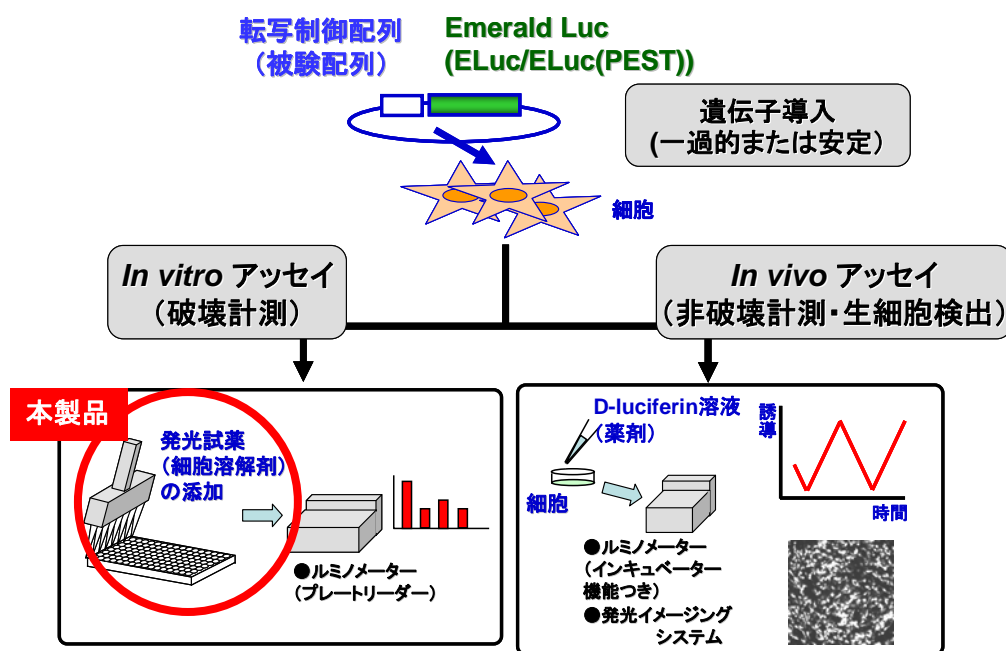
本製品に用いられるルシフェラーゼ遺伝子並びにこれらを用いた遺伝子転写活性測定技術について、独立行政法人産業技術総合研究所及び弊社より特許出願中です。本製品の利用は研究目的に限られます。研究目的以外でのご利用は弊社までお問い合わせください。

[1] はじめに

本製品は、「Emerald Luc システム」の *in vitro* アッセイ用に最適化された検出用試薬です。本試薬をご利用いただくことによって、感度の高いリポーターアッセイが可能です。

リポーターアッセイは、ある遺伝子の転写制御配列（プロモーターなど）をリポーター遺伝子と連結したプラスミドを細胞へ導入し、細胞内で発現したリポーター酵素の活性を指標に遺伝子発現を評価する手法です。特にルシフェラーゼの発光を利用したシステムは感度が高く、活性測定が簡便なことから、広く用いられています。

「Emerald Luc システム」は、産業技術総合研究所・近江谷先生らのグループとの共同研究によって開発された新規なルシフェラーゼ（Emerald Luc）を用いたリポーターアッセイシステムです（中島芳浩、近江谷克裕 *バイオテクノロジージャーナル*, 3-4, 230-232 (2006)、特許出願中）。Emerald Luc ルシフェラーゼは、ホタル由来ルシフェラーゼと同じ D-luciferin を発光基質としますが、ホタルルシフェラーゼより生細胞で安定を示し、高いシグナルが観察されます（*in vivo* アッセイ、非破壊計測）。一方で、細胞を溶解し、ルシフェラーゼ活性を測定する *in vitro* アッセイ（破壊計測）においても、ホタルルシフェラーゼと比べ発光持続性の高い検出が可能です。



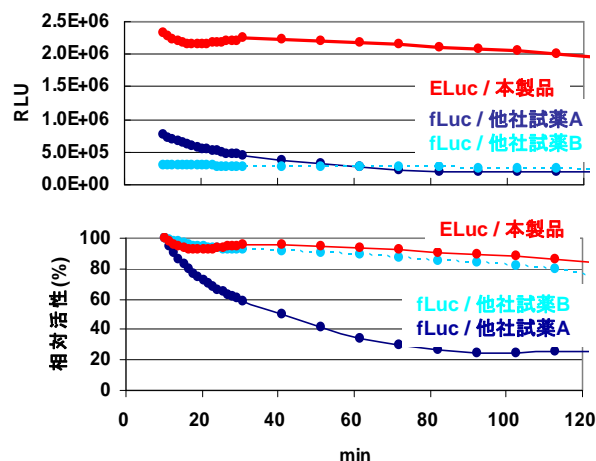
本製品には以下の特長があります。

特長 1 高い発光シグナル・高い発光持続性

本試薬は Emerald Luc ルシフェラーゼの *in vitro* アッセイ用に試薬組成を最適化しており、高い発光シグナルが得られます。さらに、本試薬による Emerald Luc ルシフェラーゼの発光は、ホタル由来ルシフェラーゼと比べ、高い持続性を示します。発光の減衰が少なく、HTS アッセイに最適です。

図 2. Emerald Luc の発光安定性、持続性

SV40 プロモーターに連結した ELuc (Emerald Luc) 及び fLuc (ホタルルシフェラーゼ) を HeLa S3 細胞にトランスフェクションし、細胞溶解後 10 分後から発光を経時的に測定した。



特長 2 簡便な操作

本試薬は細胞溶解成分を含みますので、細胞溶解・発光反応を 1 つのステップで行えます。

[2] 製品内容

| 品名 | サイズ(*1) | Code No. | 内容 | 保存温度 |
|--------------------------------------|---------|----------|-------------------------------|------|
| Emerald Luc Luciferase Assay Reagent | 10ml | ELA-101 | Luciferase Assay Reagent 10ml | -80℃ |

(*1) 96 ウェルプレートでアッセイを行う場合、ELA-101 は 100 反応分に相当します。一回の測定で検出するサンプル数が少ない場合には、初回融解時に小分注して凍結保存することをお勧めします(弊社内の検討では 3 回までの凍結融解は品質上問題ないことを確認しております)。

細胞をあらかじめ溶解し、ライセートを用いて測定を行う場合には下記の試薬を別途ご購入ください。

| 品名 | サイズ | Code No. | 内容 | 保存温度 |
|----------------------------|-------|----------|----------------------|------|
| Emerald Luc Lysis Solution | 100ml | ELA-201 | Lysis Solution 100ml | -20℃ |

[3] ご用意いただくもの

- ・プロモーターなど被験配列を挿入した Emerald Luc プラスミド
Emerald Luc ベクター (pELuc-test (Code No. ELV-101) または pELuc(PEST)-test (Code No. ELV-201)) は本製品には含まれません。別途ご購入ください。
- ・細胞、培地、トランスフェクション試薬など
- ・ルミノメーター及び適合する容器
プレートリーダーの場合は白色不透明プレートをご用意ください。

[4] 哺乳類細胞におけるアッセイ方法

1. 試薬の準備

- ・ ルシフェラーゼの活性は温度によって影響を受けますので、Luciferase Assay Reagent を十分に室温に戻してご使用ください。
- ・ Luciferase Assay Reagent は-80℃で保存し、融解は室温またはそれ以下で行ってください。水浴で溶解することをお薦めします。
- ・ 細胞も室温に戻した後、試薬を添加してください。

2. アッセイ方法

① (96 ウェルまたは 384 ウェルプレートで)細胞培養後、そのまま測定を行う場合 (図 3)

- (1) Emerald Luc 遺伝子を導入した細胞を培養します。
細胞培養し、そのまま発光試薬を加えて測定するため、ルミノメーターでの測定に適合する白色不透明プレートで培養してください。
- (2) 細胞をインキュベーターから取り出し、室温に戻します。
- (3) それぞれのウェルに細胞培養液と等量の Assay Reagent を添加します。
96 ウェルプレートでは、通常 100 μ l の細胞培養液に 100 μ l の Assay Reagent を添加します。384 ウェルプレートでは、通常 30 μ l の細胞培養液に 30 μ l の Assay Reagent を添加します。
- (4) 10 分間室温でインキュベートして細胞を完全に溶解します。
この際、振とう機で軽く振とうすると反応液が均一になり、安定した計測が行えます。
- (5) ルミノメーターで測定します。

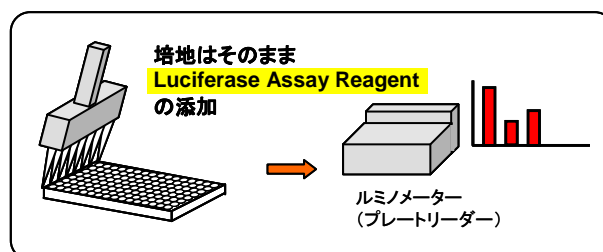


図 3. 96 または 384 ウェルプレートの検出

② 細胞をあらかじめ溶解後、測定を行う場合 (図 4)

別売の Emerald Luc Lysis Solution (Code No. ELA-201)を使用します。

- (1) Emerald Luc 遺伝子を導入した細胞を培養します。
- (2) Emerald Luc Lysis Solution を室温に戻します。
- (3) 細胞培養液から培地を除去します。
- (4) PBS でリンスします。
- (5) 細胞が浸るのに十分量の Emerald Luc Lysis Solution を加えます。添加量は下記を参考に、他の測定など必要に応じて調整してください。

| 容器 | Emerald Luc Lysis Solution 添加量 |
|------------|-----------------------------------|
| 90mm ディッシュ | 3ml |
| 60mm ディッシュ | 1ml |
| 35mm ディッシュ | 500 μ l |
| 6 ウェルプレート | 500 μ l |
| 12 ウェルプレート | 200 μ l |
| 24 ウェルプレート | 100 μ l |

- (6) 細胞容器を軽く振とうし、室温で 5 分間放置します。
- (7) ライセート適当量を測定容器に移し、等量の Assay Reagent を加え測定します。

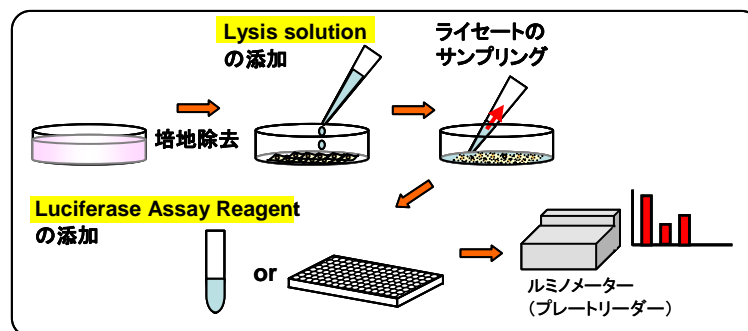


図 4. 細胞ライセートを用いる検出

[5] 哺乳類細胞におけるアッセイの例

Emerald Luc ベクター-pELuc-test (Code No. ELV-101)の Emerald Luc (ELuc)遺伝子上流に HSVtk プロモーター、さらに上流に AP1 応答エレメントを連結した pELuc/AP1 を HeLa S3 細胞に導入し、ホルボールエステルの一つ PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate) でこの細胞を刺激します。この結果、この刺激によって転写因子 AP1 が活性化され、AP1 応答エレメントに連結した ELuc の発現が誘導されます。PMA は protein kinase C (PKC)を活性化する化合物です。ここでは、この PMA 刺激による AP1 活性化に対する PKC 阻害剤の効果を調べました。

1. トランスフェクション

96 ウェルプレート白色不透明プレート(ナルジェ・ヌク社、Code No. 136101)に HeLa S3 細胞を 1 ウェルあたり 3×10^4 cells (100 μ l DMEM+10% FBS)播種し、24 時間培養しました。翌日、DMEM+0.1% FBS 培地中で 1 ウェルあたり 0.2 μ g pELuc/AP1 を 0.5 μ l Lipofectamine™ 2000(インビトロジェン社)と混合し細胞に添加し(このプラスミドとリポフェクション試薬の混合は 30 ウェル分をまとめて行いました)、さらに 24 時間インキュベートしました。

2. 阻害剤処理及び PMA による誘導

pELuc/AP1 を導入した HeLa S3 細胞を、DMEM+0.1% FBS 100 μ l 培地中で、チロシンキナーゼ阻害剤 AG555、AG825、PKC 阻害剤 BDM(Bisindolyl-maleimide I)、Ro-32-0432(すべて DMSO にて 1mM に調製)5 μ M を添加して 2 時間インキュベートし、続いて 1 μ M PMA または培地を 1/10 量加え、5 時間インキュベートしました。各条件は N=3 で実施しました。

3. 測定

CO₂ インキュベーターよりプレートを取り出し、各ウェルに Assay Reagent 100 μ l を加え、振とう機で軽く振とうしながら、10 分間放置しました。その後、パーキンエルマー社プレートリーダー(ルミノメーター)ARVOMx にて発光を測定しました。

4. 結果

各条件の平均値を算出しプロットしました(右上図)。N=3 のうちの最大値、最小値のバラツキをエラーバーで表示しています。また、右下図には PMA 誘導時の誘導なしに対するシグナルの比をプロットしました。この結果、PKC 阻害剤である BDM、Ro-32-0432 に対してのみ阻害が確認されました。一方、チロシンキナーゼ阻害剤 AG555、AG825 については、ほとんど阻害効果は認められませんでした。

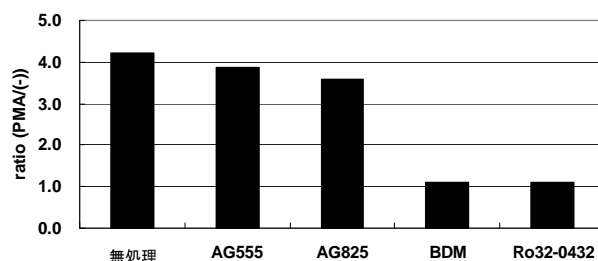
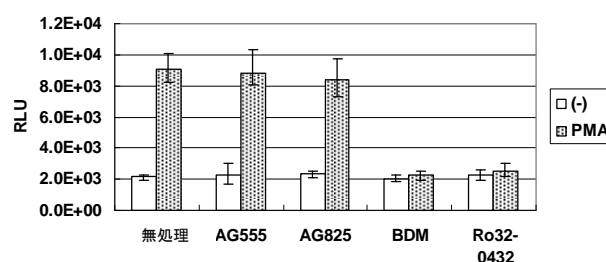


図 5. PMA による AP1 活性化に対する化合物の影響

[6] トラブルシューティング

| 現象 | 対応 |
|-------------------|--|
| シグナルが検出できない、または低い | <ul style="list-style-type: none"> ・ もともと発現の低いプロモーターの可能性がります。 ・ トランスフェクション試薬あるいは条件が不適当な可能性があります。試薬や条件を変えて実施してください。 ・ プラスミドの純度が低い可能性があります。Endotoxin の混入が少なくなるように再精製してください。 ・ ルシフェラーゼが失活した可能性があります。ライセートを室温で長時間放置しないでください。 ・ 試薬が劣化した可能性があります。新しい試薬で実施してください。 |
| 定量性が悪い | <ul style="list-style-type: none"> ・ プラスミドのトランスフェクション効率など、実験条件にバラツキがある可能性があります。できるだけ均一になるように実験プロトコルを見直してください。 ・ シグナルが低く、ノイズの影響を受けている可能性があります。シグナルが高くなるように実験条件を最適化してください。 ・ Assay Reagent が室温に戻っていない可能性があります。Assay Reagent を室温に戻してください。 ・ Assay Reagent が劣化した可能性があります。新しい試薬で実施してください。 |
| 再現性がない | <ul style="list-style-type: none"> ・ 細胞の培養条件、処理条件など、実験条件にばらつきがある可能性があります。実験条件を確認してください。 ・ ルミノメーターの不調の可能性がります。ルミノメーターの動作確認を実施してください。 |

[7] 関連商品

●Emerald Luc ルシフェラーゼベクター

| 品名 | 内容 | Code No. |
|---|------------|----------|
| Emerald Luc プロモーター挿入用ベクター pELuc-test | 20 μ g | ELV-101 |
| Emerald Luc-Short life タイプ-プロモーター挿入用ベクター pELuc(PEST)-test | 20 μ g | ELV-201 |

●Emerald Luc 細胞溶解剤

| | | |
|-----------------------------------|--------|---------|
| Emerald Luc Lysis Solution | 100 ml | ELA-201 |
|-----------------------------------|--------|---------|

●*in vivo* アッセイ

| | | |
|---|--------------------------|----------------------|
| <i>in vivo</i> アッセイ用試薬 D-luciferin(カリウム塩) | 20 mg 20mg \times 5 | MRL-101 MRL-101X5 |
|---|--------------------------|----------------------|

●多色レポーターアッセイ

| | | |
|---|------------|---------|
| MultiReporter Assay System -Tripluc[®]- プロモーター挿入用ベクター pSLG-test | 20 μ g | MRV-101 |
| MultiReporter Assay System -Tripluc[®]- プロモーター挿入用ベクター pSLO-test | 20 μ g | MRV-102 |
| MultiReporter Assay System -Tripluc[®]- プロモーター挿入用ベクター pSLR-test | 20 μ g | MRV-103 |
| MultiReporter Assay System -Tripluc[®]- SV40 コントロールベクター pSLG-SV40 control | 20 μ g | MRV-201 |
| MultiReporter Assay System -Tripluc[®]- SV40 コントロールベクター pSLO-SV40 control | 20 μ g | MRV-202 |
| MultiReporter Assay System -Tripluc[®]- SV40 コントロールベクター pSLR-SV40 control | 20 μ g | MRV-203 |
| MultiReporter Assay System -Tripluc[®]- HSVtk コントロールベクター pSLG-HSVtk control | 20 μ g | MRV-301 |
| MultiReporter Assay System -Tripluc[®]- <i>In vitro</i> アッセイ試薬 Tripluc[®] Luciferase Assay Reagent | 100 回用 | MRA-301 |



【製造・販売元】

TOYOBO 東洋紡績株式会社

－納期・注文に関するお問い合わせ－

ライフサイエンス事業部（大阪）
〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目2番8号
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

ライフサイエンス事業部（東京）
〒141-8633 東京都品川区東五反田二丁目10番2号 東五反田スクエア
TEL 03-6422-4819 FAX 03-6422-4951
E-mail: order_lifescience@toyobo.jp

－製品の内容・技術に関するお問い合わせ－

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00～12:00 , 13:00～17:00（土、日、祝を除く）
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
[URL] <http://www.toyobo.co.jp/bio>