

本コーナーでは、この実験をするためにはどの試薬を用意し、どの様に実験を進めればよいかをご案内いたします。皆さまの日々の実験にご参考ください。

MultiReporter Assay System -Tripluc[®]を用いるマルチ遺伝子発現制御解析

多色同時測定可能な新時代のマルチレポーターアッセイシステムです。

はじめに

レポーター遺伝子を用いる遺伝子発現制御解析は、レポーター遺伝子にシス作用性エレメント（プロモーター、エンハンサー、サイレンサーなど）を連結して細胞に導入し、ある条件下で発現されるレポーター酵素の活性を指標に遺伝子発現制御を評価する手法です。この方法で問題となるのは、遺伝子導入効率、細胞数、生育状態など遺伝子発現の変動に起因しない、サンプル間のバラツキが生じてしまうことです。そのため、被験対象となるレポーターの他に、内部標準となるレポーターが必要です。さらに、生命現象の発現において、様々な遺伝子が関与していることから、複数のレポーターを用いた解析は有効なツールと考えられます。

弊社では、緑色発光ルシフェラーゼ（SLG、最大発光波長550nm）、橙色発光ルシフェラーゼ（SLO、580nm）、赤色発光ルシフェラーゼ（SLR、630nm）の3色のルシフェラーゼ遺伝子を用いたマルチ遺伝子転写活性測定システムMultiReporter Assay System -Tripluc[®]を販売し、ご好評をいただいております。本稿では、あらためて本システムを用いた遺伝子発現制御解析について、実験のフローに沿ってご紹介させていただきます。

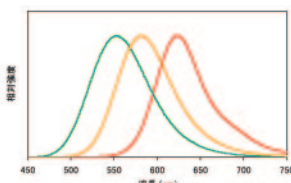


図1. 緑色・橙色・赤色発光ルシフェラーゼの発光スペクトル

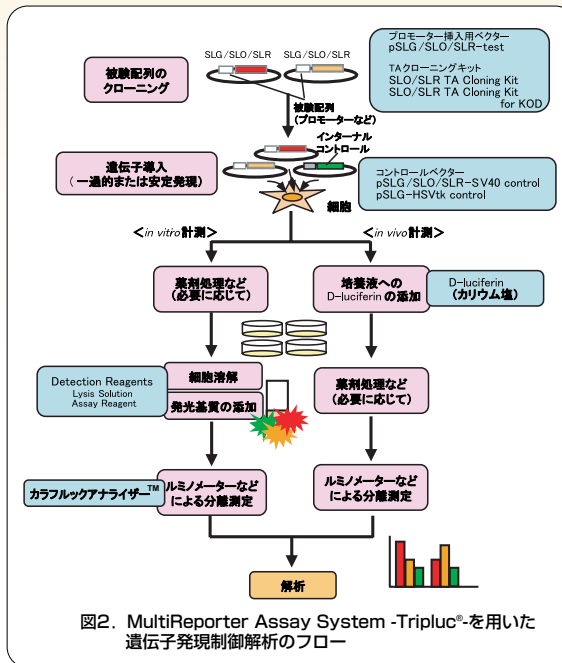


図2. MultiReporter Assay System -Tripluc[®]を用いた遺伝子発現制御解析のフロー

被験配列のクローニング

(1) ルシフェラーゼの選択

MultiReporter Assay System -Tripluc[®]では、3色の発光ルシフェラーゼをご用意しております。勿論、同時に調べたい被験配列（シス作用性エレメント）の数などによって、1色あるいは様々な組合せで2色のルシフェラーゼだけでもご使用いただけます。表1に選択の目安をまとめていますのでご参照ください。

1色でご使用いただく場合は、SLGないしSLOルシフェラーゼをご使用ください。酵素及び測定機に用いられる光電子増倍管の特性上、SLRに比べ強いシグナルを取得することが可能です。

2色でご使用いただく場合は、発光波長域の重なりが少なく、より精度の高い計測を行うことのできる、SLG、SLRの組合せをお勧めします。シグナル強度などによりSLRでは解析が難しい場合には、SLGと被験配列・内部標準の組合せを入れ替えて使用するか、SLOを用いることも可能です。

3色でご使用いただく場合には、被験配列をSLO、SLRに、内部標準をSLGとして用いることをお勧めします。シグナルの強いSLGを内部標準として用いることによって、内部標準プラスミドの添加量を低く抑えることができます。

また、サーカディアンリズムや刺激応答など、ダイナミックな遺伝子変動を解析する場合には、近日発売予定の不安定化ルシフェラーゼ（-short lifeタイプ-）をご利用ください。

(2) TAクローニング

被験配列挿入用ベクターには、各レポーター（ルシフェラーゼ）遺伝子の5'上流にマルチクローニングサイトを含むスタンダードタ

イプの他にTAクローニングタイプもあります。

TAクローニング法は制限酵素処理等を必要としないため、PCR産物を効率的にクローニングすることが可能です。弊社では、このTAクローニング技術をプロモーター解析にもご利用いただくべく、SLO/SLR TA Cloning Kitとしてご提供しております。

また、SLO/SLR TA Cloning Kit for KODは、高フィデリティ酵素の特性上平滑末端産物を生じやすく、TAクローニングを苦手とするKODシリーズのPCR産物においても、簡便にTAクローニングが行えるように工夫されたキットです。

プロモータースクリーニングなどを目的として、多くの種類の遺伝子プロモーターを同時にクローニングしたい場合、あるいは転写活性機能部位の特定のために特定プロモーターデリベーションシリーズなどを作製されたい場合など、効率的なクローニングにご利用いただけます。

遺伝子導入

通常よく用いられる1色系のアッセイでは、単に被験配列をクローニングしたベクターを用いて比較を行います。本システムではサンプル間のバラツキを補正するため、内部標準となる一定発現プロモーターに連結されたルシフェラーゼ遺伝子を有する、内部標準ベクターを同時トランスフェクションするアッセイをお奨めしています（2色系や3色系による同時解析）。MultiReporter Assay System -Tripluc[®]では構成発現プロモーターベクターとして、SV40プロモーターまたはHSVtkプロモーターをレポーターの上流に組み込んだ、2種類の内部標準用ベクターをご用意しております。

Product Selection Guide

表1. レポーターの選択の目安

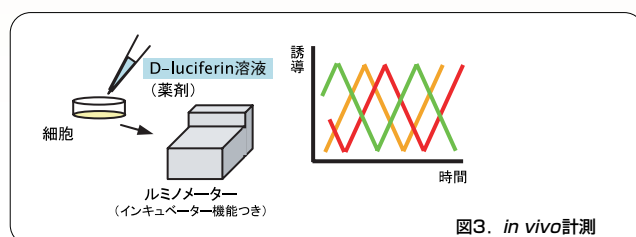
	1色系 (被験配列 1、内部標準 0)	2色系 (被験配列 1、内部標準 1)	3色系 (被験配列 2、内部標準 1)
被験配列挿入用ベクター (制限酵素を用いてクローニングする場合)	pSLG-test (Code No. MRV-101)	pSLR-test (Code No. MRV-103) *被験配列の転写活性が弱い場合 pSLG-test (Code No. MRV-101)	pSLO-test (Code No. MRV-102) pSLR-test (Code No. MRV-103)
被験配列挿入用ベクター (TAクローニングする場合)	SLO TA Cloning Kit (Code No. MRT-101) * KODシリーズを用いる場合 SLO TA Cloning Kit for KOD (Code No. MRT-201)	SLR TA Cloning Kit (Code No. MRT-102) * KODシリーズを用いる場合 SLR TA Cloning Kit for KOD (Code No. MRT-202) * 被験配列の転写活性が弱い場合 SLO TA Cloning Kit (Code No. MRT-101) SLO TA Cloning Kit for KOD (Code No. MRT-201)	SLO TA Cloning Kit (Code No. MRT-101) SLR TA Cloning Kit (Code No. MRT-102) * KODシリーズを用いる場合 SLO TA Cloning Kit for KOD (Code No. MRT-201) SLR TA Cloning Kit for KOD (Code No. MRT-202)
内部標準用ベクター	-	pSLG-SV40 (Code No. MRV-201) または pSLG-HSVtk (Code No. MRV-301) * 被験配列の転写活性が弱く、被験配列挿入にpSLG-testを用いる場合 pSLR-SV40 (Code No. MRV-203)	pSLG-SV40 (Code No. MRV-201) または pSLG-HSVtk (Code No. MRV-301)

(1) SV40プロモーター

発現活性が高いため、トランスフェクション効率の低い細胞株を用いる場合など、シグナルのレベルに問題がある場合に特に有効です。

(2) HSVtkプロモーター

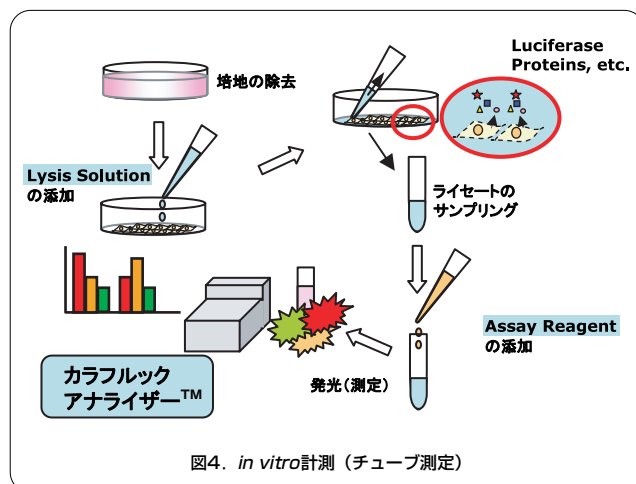
発現活性が低い一方、SV40プロモーターに比べ薬剤などの実験処理により変動する可能性が低く、より安定した内部標準として有用です。



計測

(1) *in vivo*計測 (非破壊計測)

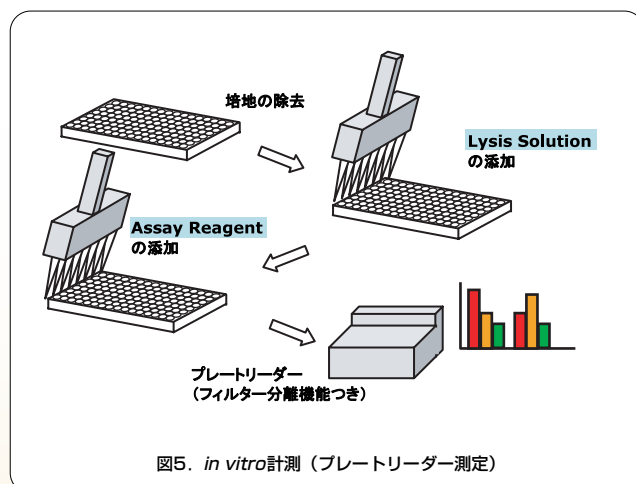
ルシフェラーゼ遺伝子が導入された細胞の培養液中にD-luciferinを添加して細胞内へ浸透させ、細胞を破壊することなく、ルシフェラーゼ活性を計測する方法です。*In vitro*計測と比較してシグナル強度は低くなりますが、同一サンプルで転写活性の経時変化を調べたい場合に有効です。インキュベーター機能付ルミノメーター (ATTO社「クロノス」など) を用いることによって、さらにリアルタイムな変動を解析することが可能です。



(2) *in vitro*計測 (破壊計測)

MultiReporter Assay System -Tripluc®- Detection Reagentを用いて検出します。

ルシフェラーゼ遺伝子が導入された細胞を必要に応じて薬剤刺激処理した後、培地を除去し、溶解剤Lysis Solutionで細胞を溶解し、このライセートに発光基質Assay Reagentを加え、発光を測定します。サンプル数が少ない場合にはライセートの一部をとり、発光基質を加え、カラフルックアナライザー™のような色分離機能つきチューブタイプのルミノメーターで測定を行うことができます。一方、サンプル数が多い場合には、白色不透明タイプの96ウェルプレートに細胞を培養し、このプレートのまま、Lysis Solutionによる細胞の溶解、Assay Reagentによる検出・測定を行います。この96ウェルプレートの使用例については、次号のUploadにてご紹介する予定です。

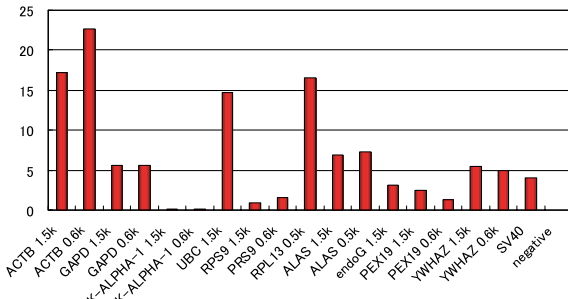


最後に、次項に2色系および3色系において、*in vitro*計測によって遺伝子発現制御解析を行った例をご紹介します。是非、一度MultiReporter Assay System -Tripluc®- をお試しください。

使用例

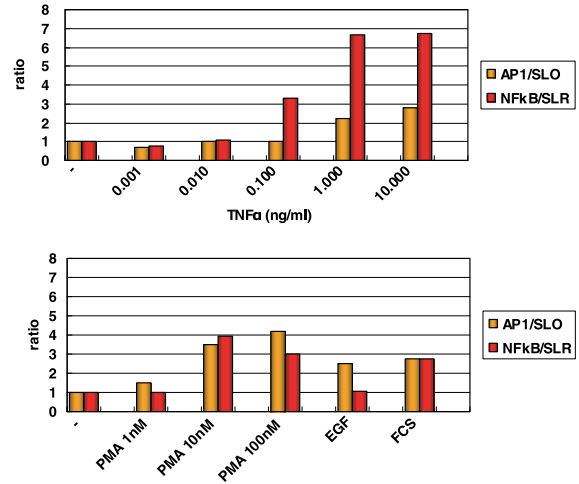
1. 2色系での使用例

ハウスキーピング遺伝子として知られる10種類の遺伝子について、転写開始（予測）点より上流1.4kbまたは0.5 kbから下流0.1kbをKOD plusでPCR増幅し、SLR TA Cloning Kit for KODを用いてSLR遺伝子上流にクローニングし、pSLG-SV40 controlとJurkat細胞にコトランスフェクションした。細胞を遠心操作で回収後、Detection Reagentsで検出し、内部標準であるSLGに対する相対活性として各遺伝子プロモーターの転写活性を評価しました（詳細は、Upload80号、P.13、14に掲載されておりますので、合わせてご参照ください）。



2. 3色系での使用例

pSLO-test、pSLR-testの上流にSV40プロモーター、さらに上流にAP1またはNFκB応答エレメントを挿入した。これら2つを内部標準HSVtk-SLGとともにHeLa S3細胞にトランスフェクションした。24時間後、下記の薬剤を添加し、3時間インキュベートした。Detection Reagentsで検出し、未処理条件のルシフェラーゼの活性を1として、各条件でのルシフェラーゼの活性をプロットしました



参考文献

1. バイオテクノロジージャーナル, 7-8: 453-455 (2005)
2. Biotechniques, 38: 891-894 (2005)

関連商品

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
プロモーター挿入用ベクター pSLG-test	20μg	-20℃	MRV-101	¥80,000
プロモーター挿入用ベクター pSLO-test	20μg	-20℃	MRV-102	¥80,000
プロモーター挿入用ベクター pSLR-test	20μg	-20℃	MRV-103	¥80,000
SV40コントロールベクター pSLG-SV40 control	20μg	-20℃	MRV-201	¥80,000
SV40コントロールベクター pSLO-SV40 control	20μg	-20℃	MRV-202	¥80,000
SV40コントロールベクター pSLR-SV40 control	20μg	-20℃	MRV-203	¥80,000
HSVtkコントロールベクター pSLG-HSVtk control	20μg	-20℃	MRV-301	¥80,000
SLO TA Cloning Kit	20回用	-20℃	MRT-101	¥65,000
SLR TA Cloning Kit	20回用	-20℃	MRT-102	¥65,000
SLO TA Cloning Kit for KOD	20回用	-20℃	MRT-201	¥69,000
SLR TA Cloning Kit for KOD	20回用	-20℃	MRT-202	¥69,000
MultiReporter Assay System -Tripluc®- in vitroアッセイ用試薬 Detection Reagents ・Lysis Solution ・Assay Reagent	100回用 500回用 10,000回用	-80℃	MRA-101 MRA-102 MRA-103	¥30,000 ¥99,000 ¥1,350,000
MultiReporter Assay System -Tripluc®- in vivoアッセイ用試薬 D-luciferin (カリウム塩)	20 mg 100 mg	-20℃	MRL-101 MRL-102	¥24,000 ¥92,000
カラフルックアナライザー™	1式	-	CLX-101	¥1,350,000

※特許の関係上、ご購入の際には別途申込書を提出していただきます。企業の方のご購入に関しては、別途ライセンスが必要です。詳しくは弊社までお問い合わせください。

※ベクターに関しては別途セット販売をしております。詳しくは、弊社までお問い合わせください。