

リポーターアッセイ用新規ルシフェラーゼベクター

Emerald Luc -pELucベクターシリーズ-

NEW

生細胞アッセイに最適ナリポーターアッセイ用ルシフェラーゼベクターです。より高感度に測定できます。

Emerald Luc システムは新規に開発されたルシフェラーゼを用いるリポーターアッセイシステムです。本システムに採用されている**ブラジル産ヒカリコメツキムシ由来ルシフェラーゼ**は、従来のホタルルシフェラーゼに比べ、生細胞において安定で、強い発光が観察されます(図1、2)。本ベクターに転写制御配列を挿入していただくことによって、生きた細胞での発光イメージングや非破壊計測によるリポーターアッセイにご利用いただけます。

また、本ルシフェラーゼは破壊系における発光安定性も高く、細胞溶解 (*in vitro*) アッセイ用のルシフェラーゼとしても最適です。

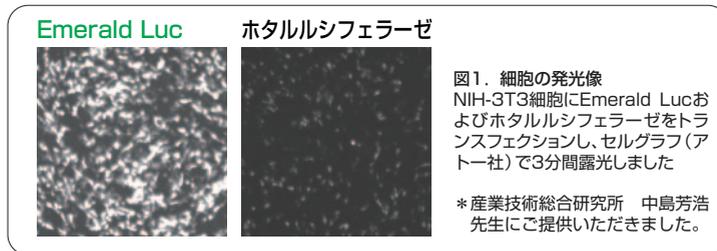


図1. 細胞の発光像
NIH-3T3細胞にEmerald Lucおよびホタルルシフェラーゼをトランスフェクションし、セルグラフ(アトー社)で3分間露光しました

* 産業技術総合研究所 中島芳浩先生にご提供いただきました。

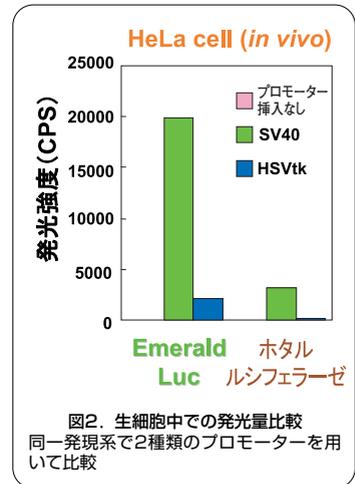


図2. 生細胞中での発光量比較
同一発現系で2種類のプロモーターを用いて比較

特長1 生細胞における高い発光

- ・ホタルルシフェラーゼと比べ、生細胞において高い発光を示します。細胞培養液にD-ルシフェリンを添加し、生細胞において発光を測定することが可能です。現在注目されている発光イメージングのプロープとして最適です。

特長2 動的な変動解析が可能 Emerald Luc -Short lifeタイプ-

- ・時計遺伝子のリズム解析などの動的変動解析用には、ルシフェラーゼのC末端に分解促進シグナル(PEST配列)を付加したEmerald Luc -Short lifeタイプ-を用いることができます。

特長3 高い発光安定性

- ・Emerald Lucはホタルルシフェラーゼと比べ、破壊系測定において高い発光安定性を示しますので、発光の減衰が少なく、HTSアッセイに最適です。 *** Emerald Luc専用破壊系 (*in vitro*) 測定試薬(リポーターアッセイ用)は近日発売予定です。**

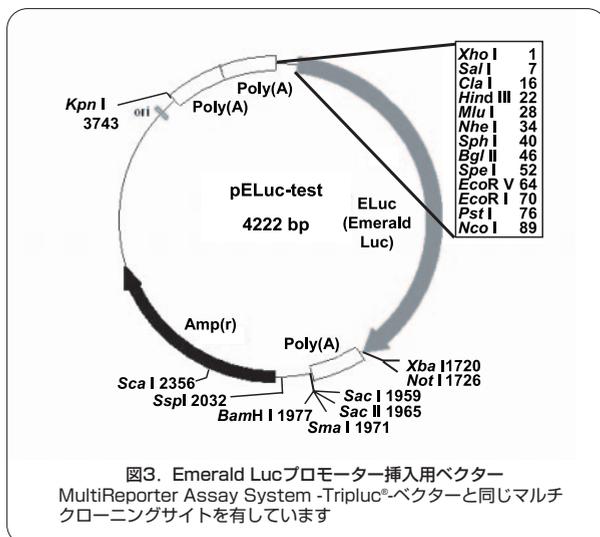


図3. Emerald Lucプロモーター挿入用ベクター
MultiReporter Assay System -Tripluc[®]-ベクターと同じマルチクロニングサイトを有しています

一口メモ

Emerald Lucは、ブラジル産ヒカリコメツキムシ *Pyrearinus termitilluminans* 由来のルシフェラーゼ²⁾ をもとに、哺乳類細胞で発現しやすいように遺伝子工学的に改変されたルシフェラーゼ遺伝子¹⁾です。本酵素は、最大発光波長538nmの緑色の発光を呈します。この発光スペクトルはpHの影響をほとんど受けません。さらに、発光検出に使用される光電子増倍管(PMT)やCCDカメラではこの領域に高い量子効率を示すものが多く、ハード面からも好適なルシフェラーゼといえます。

* 特許出願中

参考文献

- 1) バイオテクノロジージャーナル, **3-4**, 230-232 (2006)
- 2) *Photochemistry and Photobiology*, **70**: 254-260 (1999)

実施例1 ホタルルシフェラーゼとの生細胞系における性能比較

pELuc-test、pELuc (PEST)-test、及びホタルルシフェラーゼ (fLuc) の各ルシフェラーゼ遺伝子上流にAP1 応答エレメント、HSVtkプロモーターを挿入したコンストラクトを、96ウェルプレートに播種したHeLa S3細胞にトランスフェクションしました。その後、この細胞を PMAまたはEGF、及び0.2 mM ルシフェリンを含む培養液に置換して5時間インキュベートし、そのままプレートリーダーで発光を計測しました。図3上はシグナル計測値を、下は各コンストラクト毎に誘導比 (無添加を1として比率を算出) をプロットしたものです。Emerald Luc (ELuc) を用いた場合、ホタルルシフェラーゼと比べ、約15倍のシグナルが認められ、誘導の検出もホタルルシフェラーゼ (fLuc) に比べて良好でした。

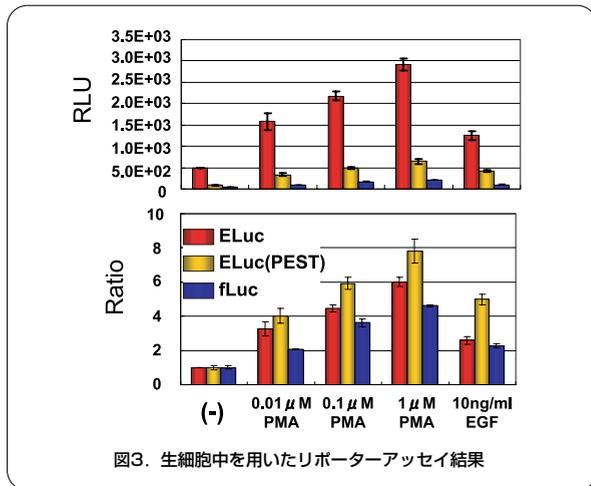


図3. 生細胞中を用いたリポーターアッセイ結果

実施例2 概日時計遺伝子の転写変動解析

pELuc-test、pELuc (PEST)-testのルシフェラーゼ遺伝子上流に概日変動性の報告されている*Bmal1* 遺伝子プロモーターを挿入したプラスミドを、NIH-3T3細胞へトランスフェクションしました。その後、その細胞を100nMデキサメタゾンで処理し、0.2mM ルシフェリンを含む培地に置換した後、培養しながら連続発光測定装置で3日間発光を測定しました。

その結果、Emerald Luc -Short lifeタイプの方が良好なリズム変動を示すことが確認できました。これは、細胞内におけるリポータータンパク質の寿命が短縮されたことに起因していると考えられます。

* 産業技術総合研究所 中島芳浩先生にご協力いただきました。

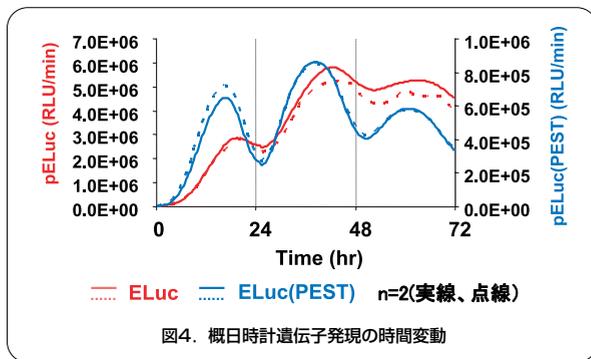


図4. 概日時計遺伝子発現の時間変動

実施例3 ホタルルシフェラーゼとの破壊系検出における性能比較

SV40プロモーターの下流にELuc、fLucを連結し、HeLa S3細胞にトランスフェクションし各ルシフェラーゼを強制発現させました。その後、ELuc導入細胞には専用の発光試薬 (近日発売予定) を、fLuc導入細胞には他社ホタルルシフェラーゼ検出用試薬AまたはBを、培養液と等量添加しました。10分間放置した後、繰り返し発光を測定し、発光の強度・推移を調べた結果が図5です。上図に発光強度を、下図に相対活性 (各測定で最初の計測値を100) を示します。結果、Emerald Luc は発光強度も高く、発光の持続時間も長いことが分かりました。

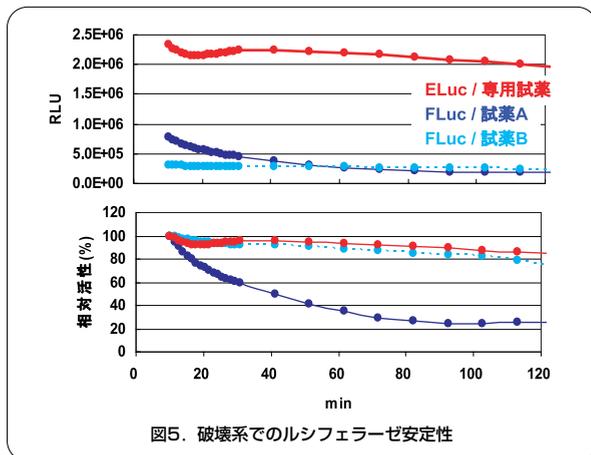


図5. 破壊系でのルシフェラーゼ安定性

品名	包装*	保存温度	Code No.	価格
Emerald Lucプロモーター挿入用ベクター pELuc-test	10μg	-20℃	ELV-101	¥35,000
Emerald Luc -Short lifeタイプ-プロモーター挿入用ベクター pELuc (PEST)-test	10μg	-20℃	ELV-201	¥35,000

* 本製品を弊社の検出用試薬 (D-luciferin Code No.:MRL-101,102) を用い、研究目的で使用する場合は、ライセンス契約の手続きはございません。弊社以外の検出用試薬を用いる場合や、研究目的以外で使用する場合は、ライセンス契約が必要です。製品にライセンスポリシーが添付されていますので、開封前に必ずご確認ください。ご不明な点は弊社までお問い合わせください。

関連商品

品名	包装*	保存温度	Code No.	価格
D-luciferin (カリウム塩)	20mg	-20℃	MRL-101	¥24,000
	100mg		MRL-102	¥92,000