



16-04



Emerald Luc Vector Series

pELuc-test (Code No. ELV-101)
pELuc(PEST)-test (Code No. ELV-201)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department

OSAKA JAPAN

A3629K

—目次—

| | | |
|-----|------------------------------|----|
| [1] | はじめに | 2 |
| [2] | 製品内容 | 3 |
| [3] | Emerald Luc ベクターの説明 | 4 |
| | 1. ルシフェラーゼ遺伝子 | 4 |
| | 2. Short life タイプのルシフェラーゼ遺伝子 | 5 |
| | 3. ベクターの構造 | 5 |
| [4] | 哺乳類細胞におけるアッセイ方法の概略 | 7 |
| | 1. 被験配列(プロモーターなど)のクローニング | 7 |
| | 2. リポーターアッセイ | 7 |
| [5] | ベクターマップ及び配列情報 | 8 |
| [6] | ベクター制限酵素認識部位及び塩基配列 | 9 |
| [7] | トラブルシューティング | 13 |
| [8] | 参考文献 | 13 |
| [9] | 関連商品 | 14 |

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

リポーター遺伝子を用いた遺伝子発現解析は、ある遺伝子のプロモーターなどの転写制御配列をリポーター遺伝子に連結したプラスミドを細胞へ導入し、この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、リポーターとして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 (1, 特許出願中)。Emerald Luc システムに用いられるルシフェラーゼは、ホタル由来ルシフェラーゼと同じ D-luciferin を発光基質としておりますが、ホタルルシフェラーゼと比べ、生細胞において安定で、シグナル強度の高い発光が観察されます。

本製品は、この Emerald Luc システムのベクターシリーズです。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、細胞を溶解し発光測定を行うような *in vitro* アッセイ (破壊計測) における発光安定性も高く、*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)。

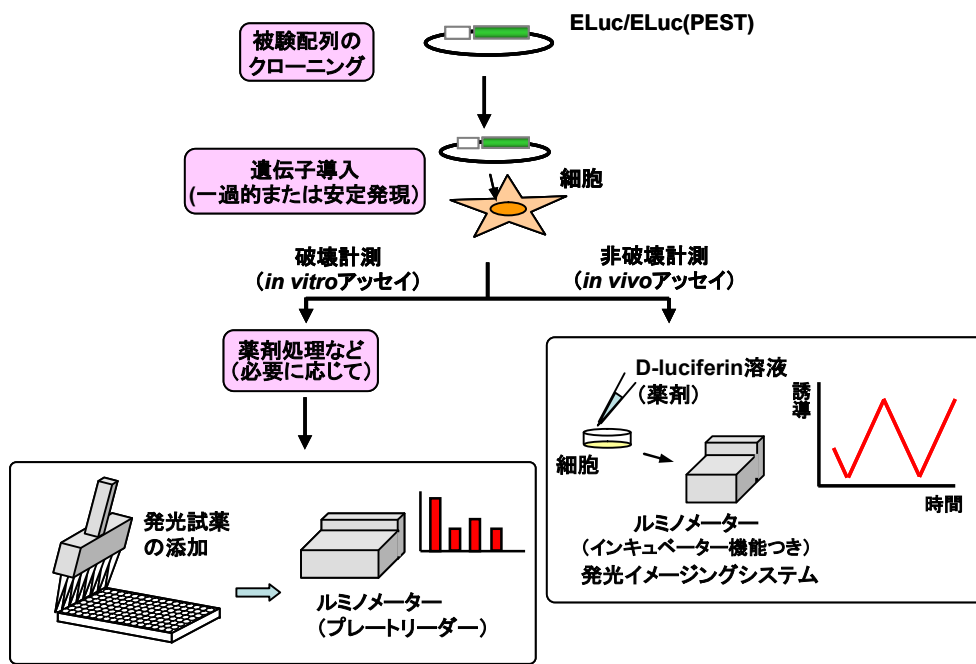


図 1. リポーターアッセイの実験フロー

本製品には以下の特長があります。

特長1 生細胞における高い発光シグナル

ホタル由来ルシフェラーゼと比べ、生細胞において高い発光が観察されます。細胞培養液に D-luciferin を添加することによって、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- (Code No. ELV-201)】

時計遺伝子のリズム解析などの特に動的な転写変動を解析するには、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- (Code No. ELV-201)が適しています。高発光検出には、スタンダードな Emerald Luc (Code No. ELV-101)をご利用ください。

特長3 高い発光安定性

ホタル由来ルシフェラーゼと比べ、*in vitro* アッセイ(破壊計測)において高い発光持続性を示しますので、発光の減衰が少なく、HTS アッセイに最適です。*In vitro* アッセイには専用の下記試薬をご利用いただけます。

Emerald Luc システム *in vitro* アッセイ用試薬

| 品名 | サイズ(*) | Code No. |
|---|--------|----------|
| Emerald Luc Luciferase Assay Reagent Neo | 10ml | ELA-301 |

(*)96 ウェルプレートでアッセイを行う場合、100 反応分に相当します。

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利用ください。

| 品名 | サイズ | Code No. |
|-----------------------------------|-------|----------|
| Emerald Luc Lysis Solution | 100ml | ELA-201 |

[2] 製品内容

Emerald Lucベクターシリーズ

| 品名 | 包装 | Code No. |
|---|------|----------|
| Emerald Luc プロモーター挿入用ベクター pELuc-test | 10µg | 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 | 10µg | ELV-201 |

[3] Emerald Luc ベクターの説明

1. ルシフェラーゼ遺伝子

Emerald Luc は、ブラジル産ヒカリコメツキ *Pyrearinus termitilluminans* 由来のルシフェラーゼ遺伝子をもとに、哺乳類細胞で効率よく翻訳される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です。ホタル由来のルシフェラーゼと同じ D-luciferin を発光基質としておりますが、生細胞においてより高い発光が観察されます(図 2,3,4)。また、一般的に行われる細胞を溶解して行う検出においても優れた発光安定性を示します(図 5)。

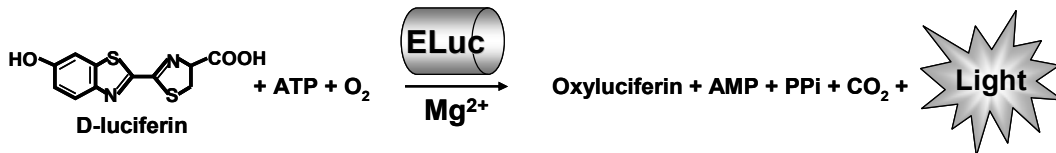


図 2. Emerald Luc による発光反応

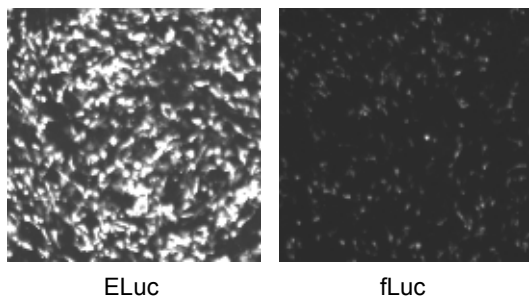


図 3. 細胞の発光像

Emerald Luc (ELuc)とホタルルシフェラーゼ(fLuc)を NIH3T3 細胞にトランスフェクションして各ルシフェラーゼを発現させ、培地に 0.2 mM D-luciferin を加え、細胞を撮影しました。

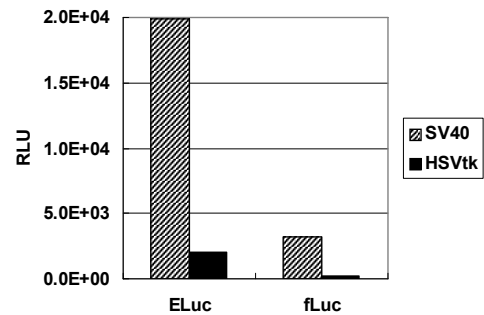
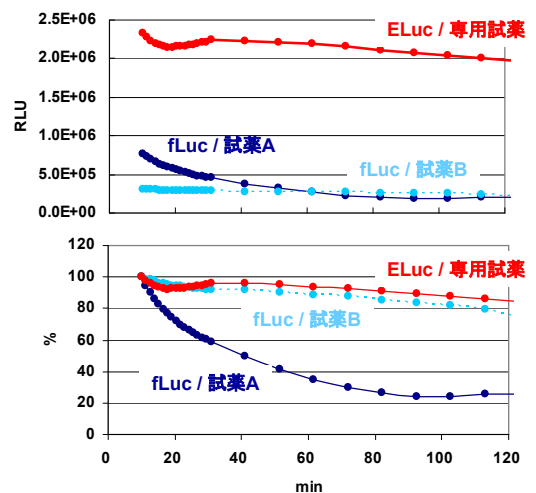


図 4. 生細胞中での発光量比較

SV40 プロモーター及び HSVtk プロモーターに Emerald Luc (ELuc)とホタルルシフェラーゼ(fLuc)に連結し、HeLa S3 細胞にトランスフェクションしました。24 時間後に培地に 0.2 mM D-luciferin を添加し、発光を測定しました。

図 5. 細胞破壊検出における発光安定性

SV40 プロモーターの下流に Emerald Luc (ELuc)とホタルルシフェラーゼ(fLuc)を連結し、CHO 細胞にトランスフェクションし各ルシフェラーゼを発現させました。ELuc 導入細胞には専用の発光試薬 (Emerald Luc Luciferase Assay Reagent (Code No. ELA-101)) 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・推移を調べました。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。



Emerald Luc 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。

2. Short life タイプのルシフェラーゼ遺伝子

一般に、一度発現したルシフェラーゼなどのリポータータンパク質が細胞内に比較的長時間とどまることによってバックグラウンドとなるシグナルが生じ、遺伝子発現の変化を過小評価してしまうケースがあります。Li らは、マウス ornithine dehydrogenase 由来 PEST 配列をリポーターに付加することによって、リポータータンパク質を不安定化させることに成功しました(2)。Short life タイプベクターはこの技術を応用した高レスポンス型ルシフェラーゼベクターです。Emerald Luc の C 末端に PEST 配列を連結されているので、細胞内においてルシフェラーゼが速やかに分解されます(図 6、7)。この結果、該日時計遺伝子の転写変動など、動的な発現変動が解析しやすくなっています(図 8)。

図 6. スタンダードタイプの Emerald Luc と Short life タイプの Emerald Luc (PEST)



図7. Emerald Luc及びShort lifeタイプの細胞内安定性

Emerald Luc(ELuc)、Emerald Luc –Short lifeタイプ (ELuc(PEST))を安定発現するCHO細胞をシクロヘキシミド処理して翻訳反応を停止させました。その後、各経過時間における残存発光活性を測定し、プロットしました。●及び破線:ELuc、▲及び実線:ELuc(PEST)。この結果、Emerald Luc –Short lifeタイプ (ELuc(PEST))の細胞内半減期は約3時間と見積もられました。

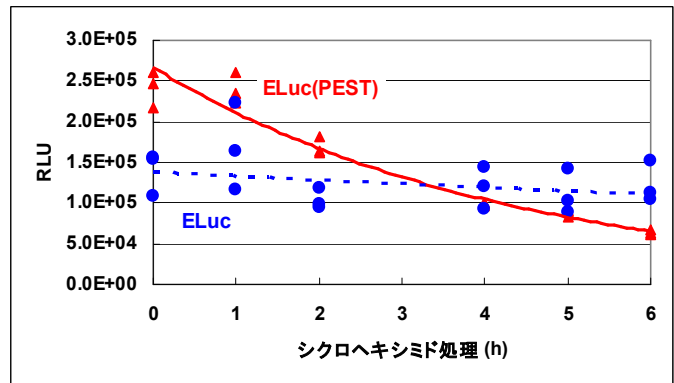
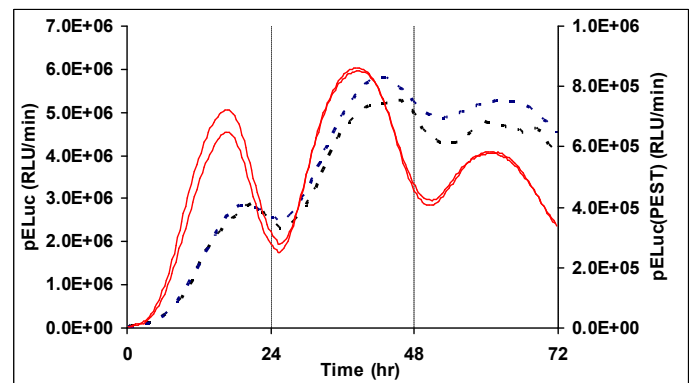


図 8. 概日時計遺伝子の転写変動解析

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、NIH3T3 細胞へトランスフェクションしました。その後、この細胞を 100nM デキサメタゾンで処理し、0.2mM D-luciferin を含む培地に置換し、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。破線は ELuc、実線は ELuc(PEST)を示します。



3. ベクターの構造

Emerald Luc ベクターシリーズは、弊社 MultiReporter Assay System –Tripluc®– ベクターシリーズと同じマルチクロニングサイトを有しております。その他、Emerald Luc ベクターシリーズは以下のエレメントを有しております(ベクターマップは p. 8 に示します)。

SV40 late poly(A) signal

ポリアデニル化シグナルは RNA Polymerase II の転写終結に寄与し、転写産物の 3'末端に 200~250 bp

程度のアデノシンを付加します。これにより、RNA の安定性や翻訳効率が増大します。

Background reduction signal

ポリアデニル化シグナルである AATAAA を 2 つ含む SV40 early poly(A) signal をタンデムにルシフェラーゼ遺伝子の上流に配置し、より強力な転写終結のためのシグナルとしてベクターバックボーンに起因するノイズシグナルを低減します(3)。マルチクローニングサイトの上流にタンデムに配置されているため、インサート確認用のプライマーを設計される場合には注意が必要です。(p.7 をご参照下さい)。

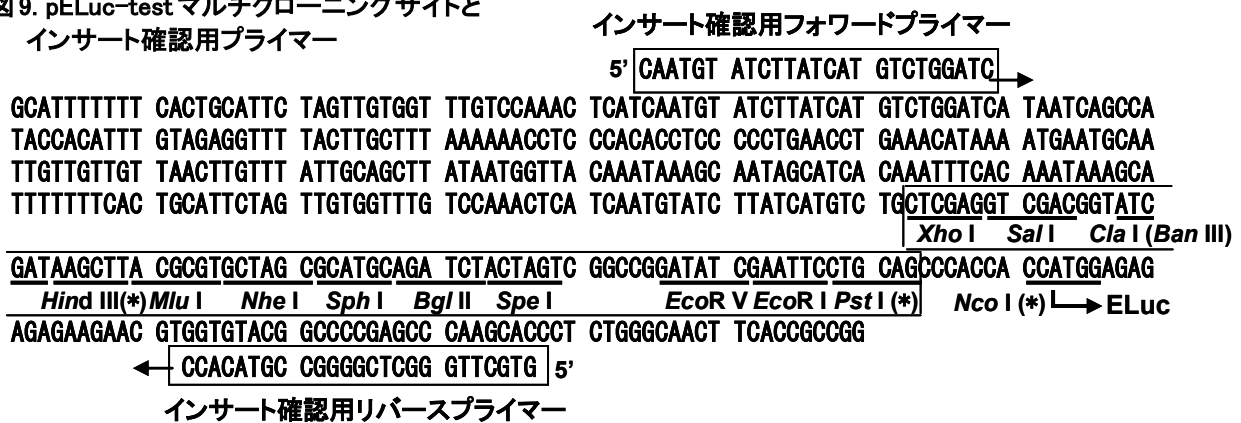
[4] 哺乳類細胞におけるアッセイ方法の概略

1. 被験配列(プロモーターなど)のクローニング

pELuc-test、pELuc(PEST)-test のマルチクローニングサイトへプロモーターなどの転写制御配列をクローニングします。被験配列のクローニングには、弊社 high fidelity ホットスタート PCR 酵素 KOD -Plus- (Code No. KOD-201) や KOD -Plus- Ver.2 (Code No. KOD-211) のご使用をお薦めいたします。

インサートをご確認いただくためのコロニーダイレクト PCR あるいはシーケンス反応には、下記の挿入配列確認用プライマーのご使用をお薦めいたします。

図9. pELuc-test マルチクローニングサイトと
インサート確認用プライマー



(注1) pELuc(PEST)-test もマルチクローニングサイトは同じ塩基配列を有しておりますが、(*) 印の制限酵素はベクター内の他の部位も切断しますので、クローニング部位としてはお薦めできません。インサート確認用プライマーは同じ配列のものを使用できます。

(注2) バックグラウンド低減シグナルとして SV40 poly(A) signal が複数配置されているため、プライマーをマルチクローニングサイトの上流近傍に設計されますと、PCR 反応やシーケンス反応を上手く行うことができません。

2. リポーターアッセイ

プロモーターなどの被験配列を Emerald Luc に連結したプラスミドを哺乳類細胞へトランスフェクションします。その後、必要に応じて調べたい薬剤で細胞を処理し、Emerald Luc の活性を測定します。測定方法については下記の2種類の方法があります。

(1) 生細胞アッセイ(非破壊計測、*in vivo* アッセイ)

細胞培養液に 0.2~1 mM D-luciferin (Code No. MRL-101) を添加し、調べたい条件で細胞をインキュベートし、ルミノメーターあるいは発光イメージングシステムで検出します。生細胞でアッセイするため、時間経過による変動解析、リアルタイム解析が可能です。特に、発光イメージングシステムではシングルセルで転写変動を解析できます。

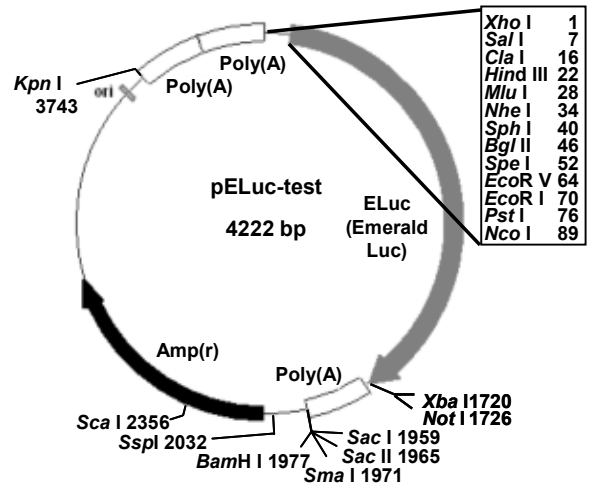
(2) *in vitro* アッセイ(破壊計測)

調べたい条件で細胞をインキュベートした後、細胞溶解・発光反応を行う Emerald Luc Luciferase Assay Reagent Neo (Code No. ELA-301) を培地と等量添加します。10 分間インキュベートした後、発光をルミノメーターで検出します。生細胞計測に比べ、発光強度の高い測定が可能です。

[5] ベクターマップ及び配列情報

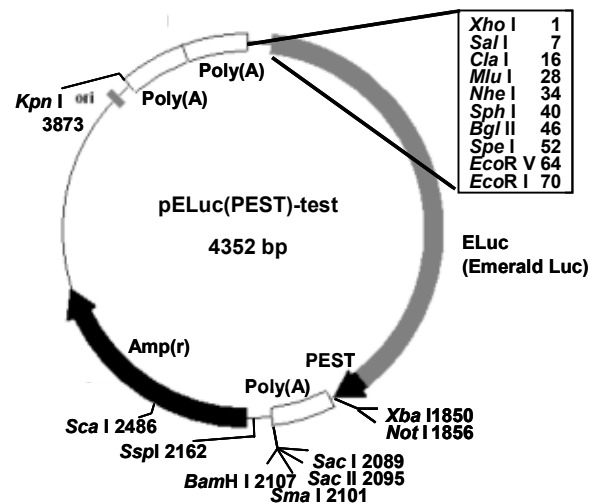
(1) pELuc -test

| pELuc-test | |
|-----------------------------------|-----------|
| Multiple cloning region | 1-89 |
| Emerald Luc gene (ELuc) | 91-1719 |
| SV40 late poly(A) signal | 1733-1958 |
| β -lactamase (Amp (r)) gene | 2052-2912 |
| background reduction signal | 3743-4222 |



(2) pELuc(PEST)-test

| pELuc(PEST)-test | |
|-----------------------------------|-----------|
| Multiple cloning region | 1-70 |
| Emerald Luc gene (ELuc) | 91-1716 |
| PEST | 1717-1839 |
| SV40 late poly(A) signal | 1863-2087 |
| β -lactamase (Amp (r)) gene | 2182-3042 |
| background reduction signal | 3873-4352 |



(注) pELuc(PEST)-test についても、制限酵素 *Hind* III、*Pst* I、*Nco* I の認識配列が ELuc 遺伝子上流のマルチクローニングサイトに存在しますが、ベクター内の他の部位にも存在しますので、クローニング部位としてはお薦めできません。

[6] ベクター制限酵素認識部位及び塩基配列

(1) pELuc -test

表 1. pELuc ベクターを 1 または 2 箇所切断する制限酵素

| 酵素 | 箇所 | 切断部位 | 酵素 | 箇所 | 切断部位 | 酵素 | 箇所 | 切断部位 |
|----------------|----|-----------|-----------------|----|-----------|---------------|----|------|
| <i>Acc</i> I | 2 | 7 1110 | <i>Eco</i> RV | 1 | 64 | <i>Pvu</i> I | 1 | 2467 |
| <i>Alw</i> 44I | 2 | 2167 3413 | <i>Ehe</i> I | 1 | 1546 | <i>Sac</i> I | 1 | 1959 |
| <i>Ase</i> I | 1 | 2663 | <i>Fsp</i> I | 1 | 2614 | <i>Sac</i> II | 1 | 1965 |
| <i>Bam</i> HI | 1 | 1977 | <i>Hae</i> II | 2 | 1546 3483 | <i>Sal</i> I | 1 | 7 |
| <i>Ban</i> III | 1 | 16 | <i>Hin</i> II | 2 | 1546 2298 | <i>Sca</i> I | 1 | 2356 |
| <i>Bcl</i> I | 2 | 932 1400 | <i>Hind</i> III | 1 | 22 | <i>Sma</i> I | 1 | 1971 |
| <i>Bgl</i> I | 1 | 2715 | <i>Kpn</i> I | 1 | 3743 | <i>Spe</i> I | 1 | 52 |
| <i>Bgl</i> II | 1 | 46 | <i>Mlu</i> I | 1 | 28 | <i>Sph</i> I | 1 | 40 |
| <i>Bst</i> XI | 2 | 83 285 | <i>Nar</i> I | 1 | 1546 | <i>Ssp</i> I | 1 | 2032 |
| <i>Cfr</i> 9I | 1 | 1971 | <i>Nco</i> I | 1 | 89 | <i>Sty</i> I | 1 | 89 |
| <i>Cla</i> I | 1 | 16 | <i>Nhe</i> I | 1 | 34 | <i>Xba</i> I | 1 | 1720 |
| <i>Eco</i> 52I | 2 | 58 1727 | <i>Not</i> I | 1 | 1726 | <i>Xho</i> I | 1 | 1 |
| <i>Eco</i> 81I | 2 | 484 1611 | <i>Ppu</i> M I | 1 | 1257 | <i>Xmn</i> I | 1 | 2235 |
| <i>Eco</i> RI | 1 | 70 | <i>Pst</i> I | 1 | 76 | | | |

表 2. pELuc-test ベクター内に認識部位のない制限酵素

| | | | | | | | | | |
|-----------------|---------------|----------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|---------------|----------------|----------------|
| <i>Aat</i> I | <i>Aat</i> II | <i>Afl</i> II | <i>Apa</i> I | <i>Bbr</i> PI | <i>Bfr</i> I | <i>Bpu</i> 1102I | <i>Bsi</i> WI | <i>Bss</i> HII | <i>Bst</i> EII |
| <i>Csp</i> 45 I | <i>Csp</i> I | <i>Dra</i> III | <i>Eco</i> 105I | <i>Eco</i> 47III | <i>Eco</i> T22I | <i>Mro</i> I | <i>Msc</i> I | <i>Nde</i> I | <i>Nru</i> I |
| <i>Nsp</i> V | <i>Pac</i> I | <i>Pvu</i> II | <i>San</i> D I | <i>Sfi</i> I | <i>Srf</i> I | | | | |

pELuc-test ベクター配列 (弊社ウェブサイトからダウンロード可能です。)

```

1  ctcgaggtcg acggtatcga taagcttacg cgtgctagcg catgcagatc tactagtcgg ccgatatcgc aattcctgca
81  gccaccacc atggagagag agaagaacgt ggtgtacggc cccgagccca agcaccctct gggcaacttc accgccggcg
161 agatgctgta caacgctctg cacaagcact cccacatccc ccaggccatc ctggacgtga tggcaacga gtccctttcc
241 taccaggagt tcttcgacac tactgtgaag ctgggcccaga gcctccagaa ctgtggctac aagatgaac atgtcgtgtc
321 gatctgtgca gagaacaaca agagattctt catccccatc atctccgctt ggtacatcgg catggtggtg gccctgtgta
401 acgaggacta tatcccagac gagctgtgta aagtgaccgg catctccaag ccgatcctgg tcttcaccac taggaagatc
481 ctgcctaagg ttttgagggt taaagacaga accaactaca taaaggaggat catcactactg gactctgaag agaactgctt
561 gggctgcgag agcctgcaca acttcatgtc caggctactc gacaacaacc tccaacatt caagcctctg cactacgacc
641 ctgtggacca gtagccgcc atcctgtgct cctccggcac aaccggcctg cctaaaggcg tgatcgacac ccacaggaac
721 atctgtgtga gactcacaca cgcactgtac cccagagtgg gtacacaact catccccggc gtatccgtgc tggcctacct
801 gccattcttc caagccttgc gcttcagtat caacctgggc tatttcatgg tggcctgag agtgggtgat ctccgaaggt
881 ttaaccagga ggtgttctg aaggccatcc aggactacga ggtgaggagc gtgatcaacg ttccctccac aatcctgttc
961 ctgtccaaga gcctctggtt ggacaagtac gacctatcca cctggcggga gctgtgctgt ggagocgctc ctctggcgaa
1041 ggaggtggcc gagatcgccg tgaaggaggc gaacctgcca gggatacggg tggctacgg tctaacagag tctacctccg
1121 ccaacatcca tactctgcac aacgagttca agtccggctc cctgggcaag gtgacacctt acatggccgc caagatcctc
1201 gacaggaaca ccggcgaggc cctgggtcca aaccaggctg gcgagctgtg catctgggga cctatggtaa caaaaggcta
1281 tgtgaacaac ccacaggcta ctaaggaggc catcgacgac gacggctggc tgcaactctg cgacttcggc tactacgacg
1361 aggacgagta ttctacatc gtggaccggt acaaggagct gatcaaatac aagggctatc aggtcgcccc tgtggagctg
1441 gaggagatcc tcttcagca cccaggcatc agggcagctg ccgtcgtggg tatccctgac atcagggccg gcgagctgcc
1521 agccggcttc gtggtgaagc agccggcgc ccaactcacc gctaaggagg tgtacgactt cctggcccag aggggtgtctc
1601 actccaagta cctgaggggc ggcgtaaggt tcgtggactc tatcccagg aactgacag gcaagattag tcgaaaagag
1681 ctgagggagg ccctgatgga gaaggcttct aagctgtaat ctgagcggc cgcccagaca tgataagata cattgatgag
1761 tttggacaaa ccacaactag aatgcagtga aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt tatttgaac

```

1841 cattataagc tgcaataaac aagttaacaa caacaattgc attcatttta tgtttcaggt tcagggggag gtgtgggagg
1921 ttttttaag caagtaaac ctctacaaat gtggtatgga gctcccggg cccgggggat cctcaaatat gtatccgctc
2001 atgagacaat aacctgata aatgottcaa taatatgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgcctt
2081 tattcccttt tttgcccatt tttgcccatt tgtttttgct caccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc
2161 agttgggtgc acgagtgggt tacatogaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gttttgccc ogaagaactg
2241 tttccaatga tgagcacttt taaagtctg ctatgtggcg cggtattatc ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg
2321 togccgcata cactattctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag
2401 taagagaatt atgcagtctc gccataacca tgagtataa cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg
2481 aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg ggggacatg taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc
2561 cataccaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgtgaca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggccaactac
2641 ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga ggccgataaa gttgcaggac cacttctgag ctcggccctt
2721 ccggctggct gttttattgc tgataaatct ggagccgggt agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga
2801 tggtaagccc tccogtatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgcgtg
2881 agatagtgct ctcactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt
2961 ctttttaat ttaaaaggat ctaggtgaag atcctttttg ataatctcat gacaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt
3041 ccaactgagc tcagaccocg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaate tgctgcttgc
3121 aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc
3201 ttcagcagag gcagataacc aaatactggt cttctagtgt agccgtagt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc
3281 goctacatac ctgcctctgc taatcctggt accagtggct gctgccagt gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact
3361 caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggg tctgtcacac agcccagctt ggagcgaacg
3441 acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcggcac gcttccgaa gggagaaagg cggacaggta
3521 tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtctg
3601 tccggtttgc ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca gggggcgga gcctatgaa aaacgccagc
3681 aacggccct ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt ttgctcatat gttctttcct gcggtaccga tcataatcag
3761 ccataccaca tttgtagagg ttttacttgc tttaaaaaac ctcccacacc tcccctgaa cctgaaacat aaaaatgatg
3841 caattgtgtg tgtaacttg tttattgcag cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaatth cacaataaa
3921 gcattttttt cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac tcaatcaatg atcttatcat gtctggatca taatcagcca
4001 taccacattt gtgaggttt tacttgcttt aaaaaacct ccacacctcc ccctgaacct gaaacataaa atgaatgcaa
4081 ttgttgtgtg taacttgttt attgcagctt ataatggtta caaataaagc aatagcatca caaatctac aaataaagca
4161 tttttttcac tgcattctag ttgtgtttg tccaaactca tcaatgtatc ttatcatgtc tg

(2) pELuc(PEST) -test

表 1. pELuc(PEST)ベクターを 1 または 2 箇所切断する制限酵素

| 酵素 | 箇所 | 切断部位 | 酵素 | 箇所 | 切断部位 | 酵素 | 箇所 | 切断部位 |
|----------------|----|-----------|-----------------|----|-----------|---------------|----|---------|
| <i>Acc</i> I | 2 | 7 1110 | <i>Eco</i> RV | 1 | 64 | <i>Pvu</i> I | 1 | 2597 |
| <i>Alw</i> 44I | 2 | 2297 3543 | <i>Ehe</i> I | 1 | 1546 | <i>Sac</i> I | 1 | 2089 |
| <i>Ase</i> I | 1 | 2793 | <i>Fsp</i> I | 1 | 2744 | <i>Sac</i> II | 1 | 2095 |
| <i>Bam</i> HI | 1 | 2107 | <i>Hae</i> II | 2 | 1546 3613 | <i>Sal</i> I | 1 | 7 |
| <i>Ban</i> III | 1 | 16 | <i>Hin</i> II | 2 | 1546 2428 | <i>Sca</i> I | 1 | 2486 |
| <i>Bcl</i> I | 2 | 932 1400 | <i>Hind</i> III | 2 | 22 1711 | <i>Sma</i> I | 1 | 2101 |
| <i>Bgl</i> I | 1 | 2845 | <i>Kpn</i> I | 1 | 3873 | <i>Spe</i> I | 1 | 52 |
| <i>Bgl</i> II | 1 | 46 | <i>Mlu</i> I | 1 | 28 | <i>Sph</i> I | 1 | 40 |
| <i>Bst</i> XI | 2 | 83 285 | <i>Nar</i> I | 1 | 1546 | <i>Ssp</i> I | 1 | 2162 |
| <i>Cfr</i> 9I | 1 | 2101 | <i>Nco</i> I | 2 | 89 1719 | <i>Sty</i> I | 2 | 89 1719 |
| <i>Cla</i> I | 1 | 16 | <i>Nhe</i> I | 1 | 34 | <i>Xba</i> I | 1 | 1850 |
| <i>Eco</i> 52I | 2 | 58 1857 | <i>Not</i> I | 1 | 1856 | <i>Xho</i> I | 1 | 1 |
| <i>Eco</i> 81I | 2 | 484 1611 | <i>Ppu</i> M I | 1 | 1257 | <i>Xmn</i> I | 1 | 2365 |
| <i>Eco</i> RI | 1 | 70 | <i>Pst</i> I | 2 | 76 1805 | | | |

表2. pELuc(PEST)-testベクター内に認識部位のない制限酵素

| | | | | | | | | | |
|--------------|----------------|-----------------|------------------|-----------------|--------------|---------------|----------------|----------------|----------------|
| <i>Aat</i> I | <i>Aat</i> II | <i>Afl</i> II | <i>Apa</i> I | <i>Bbr</i> PI | <i>Bfr</i> I | <i>Bsi</i> WI | <i>Bss</i> HII | <i>Bst</i> EII | <i>Csp</i> 45I |
| <i>Csp</i> I | <i>Dra</i> III | <i>Eco</i> 105I | <i>Eco</i> 47III | <i>Eco</i> T22I | <i>Mro</i> I | <i>Msc</i> I | <i>Nde</i> I | <i>Nru</i> I | <i>Nsp</i> V |
| <i>Pac</i> I | <i>Pvu</i> II | <i>Sar</i> D I | <i>Sfi</i> I | <i>Srf</i> I | | | | | |

pELuc(PEST)-test ベクター配列 (弊社ウェブサイトからダウンロード可能です。)

```

1  ctcgaggtcg acggtatcga taagcttacg cgtgctagcg catgcagatc tactagtcgg ccgatatcgc aattcctgca
81  gcccaccacc atggagagag agaagaacgt ggtgtacggc cccgagccca agcaccctct gggcaacttc accgccggcg
161 agatgctgta caogctctg cacaagcact cccacatccc ccaggccatc ctggacgtga tggcaacga gtccctttcc
241 taccaggagt tcttcgacac tactgtgaag ctgggcccaga gcctccagaa ctgtggctac aagatgaacg atgtcgtgtc
321 gatctgtgca gagaacaaca agagattctt catccccatc atctccgctt ggtacatcgg catggtggtg gccctgtgta
401 acgaggacta tatcccagac gagctgtgta aagtgaaccg catctccaag ccgatcctgg tcttcaccac taggaagatc
481 ctgcctaagg ttttgagggt taaagacaga accaactaca taaagaggat catcactactg gactctgaag agaacctgct
561 gggctgcgag agcctgcaca acttcatgtc caggctactc gacaacaacc tccaacattt caagcctctg cactacgacc
641 ctgtggacca ggtagccgcc atcctgtgct cctccggcac aaccggcctg cctaaaggcg tgatgcagac ccacaggaac
721 atctgtgtga gactcacaca cgcatctgac cccagagtgg gtacacaact catccccggc gtatccgtgc tggcctacct
801 gccattcttc cacgccttcg gcttcagtat caacctgggc tatttcatgg tgggcctgag agtgggtgat ctccgaaggt
881 ttaaccagga ggtgttctg aaggccatcc aggactacga ggtgaggagc gtgatcaacg ttccctccac aatcctgttc
961 ctgtccaaga gcctctggtt ggacaagtac gacctatcca ccttggcggg gctgtgctgt ggagccgctc ctctggcgaa
1041 ggaggtggcc gagatcgccg tgaagaggct gaacctgcca gggatacggg tggctacggg tctaacagag tctacctccg
1121 ccaacatcca tactctgcac aacgagttca agtccggctc cctgggcaag gtgacacctt acatggccgc caagatcacc
1201 gacaggaaca ccggcgaggc cctgggtcca aaccaggctg gcgagctgtg catctgggga cctatggtaa caaaaggcta
1281 tgtgaacaac ccacaggcta ctaaggaggc catcgacgac gacggctggc tgcaactctg cgaactcggc tactacgacg
1361 aggacgagta tttctacatc gtggaccggt acaaggagct gatcaaatac aagggctatc aggtcgcgcc tgtggagctg
1441 gaggagatcc tcttcagca cccaggcatc agggcagctg ccgtcgtggg tatccctgac atcaggccgc gcgagctgcc
1521 agccggcttc gtggtgaagc agccggcgcc ccaactcacc gctaaggagg tgtacgactt cctggcccag aggggtgtctc
1601 actccaagta cctgaggggc ggcgtaaggt tcgtggactc tatcccaggc aactgacagc gcaagattag tcgaaaagag
1681 ctgagggagg ccctgatgga gaaggcttct aagcttagcc atggcttccc gccggagggtg gaggagcagg ctgctggcac
1761 gctgcccattg tcttctgccc aggagagcgg gatggaccgt caccctgcag cctgtgcttc tgctaggatc aatgtgtaga
1841 tgccattctt ctgagcgggc cgcccagaca tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag aatgcagtga
1921 aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt tatttgaac cattataagc tgcaataaac aagttaacaa
2001 caacaattgc attcatttta tgtttcaggt tcagggggag gtgtgggagg ttttttaaag caagtaaac ctctacaaat
2081 gtggtatgga gctcccgccg cccgggggat cctcaaatat gtatccgctc atgagacaat aacctgata aatgcttcaa
2161 taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgcctt tattcccttt tttcggcatt tttgcttcc
2241 tgtttttgct caccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtggtt tacatcgaac
2321 tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gttttcggcc cgaagaactt ttccaatga tgagcacttt taaagtctg
2401 ctatgtggcg cgttattatc ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgcata cactattctc agaatgactt
2481 ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttaaggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgtc gccataacca
2561 tgagtgataa cactgcggcc aactacttct tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg
2641 ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg acaccaogat
2721 gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcgaaactc ttactctagc ttcccggcaa caattaatag
2801 actggatgga ggcgataaaa gttgcaggac cacttctgcg ctccggcctt ccggctggct ggtttattgc tgataaatct
2881 ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggcccaga tgtaagccc tcccgtatcg tagttatcta
2961 cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgtcg agataggtgc ctactgattt aagcattggt
3041 aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt catttttaat ttaaaggat ctagtgaag
3121 atcctttttg ataactcat gacaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat
3201 caaaggatct tcttgagatc cttttttctt gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg
3281 tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactggt
3361 cttctagtgt agccgtagt t aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctgcctctgc taatcctggt
3441 accagtggct gctgccagt gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc
3521 ggtcgggctg aacggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt
3601 gagctatgag aaagcggcac gcttcccga gggagaaagg cggacaggta tccgtaagc ggcagggtcg gaacaggaga
3681 gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc
3761 gattttttgtg atgctcgtca gggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgggcctt ttttacggtt cctggccttt

```

3841 tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcggtaccga tcataatcag ccataccaca tttgtagagg ttttacttgc
3921 tttaaaaaac ctcccacacc tcccctgaa cctgaaacat aaaatgaatg caattgttgt tgtaacttg tttattgcag
4001 cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa gcattttttt cactgcattc tagttgtggt
4081 ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctggatca taatcagcca taccacattt gtagaggttt tacttgcttt
4161 aaaaaacctc ccacacctcc cctgaaacct gaaacataaa atgaatgcaa ttgttgttgt taacttgttt attgcagctt
4241 ataatggta caaataaagc aatagcatca caaatttcac aaataaagca tttttttcac tgcattctag ttgtggtttg
4321 tccaaactca tcaatgtatc ttatcatgtc tg

[7] トラブルシューティング

(1) クローニング

| 現象 | 対応 |
|-------------------------|---|
| ターゲット領域の PCR 増幅が上手くいかない | ターゲット領域に GC リッチな領域が含まれる場合、PCR 反応効率が低下することがあります。下記のように PCR を行うことによって改善される場合があります。 <ul style="list-style-type: none">・ PCR を 2 ステップサイクルにする。・ PCR の Denature ステップを 98°C、10 秒にする。・ 5%程度の DMSO を PCR 反応液に添加する。 |
| コロニーダイレクト PCR が上手くいかない | 適切なプライマーを使用してください(p.5 参照)。 また、上記のように PCR を行うことによって改善される場合があります。 |

(2) トランスフェクション

| 現象 | 対応 |
|------------------------|--|
| ルシフェラーゼが発現しない、または発現が低い | <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ありません。・ 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。・ プラスミド抽出の際、大腸菌が混入した可能性があります(顕微鏡で観察すると、細胞以外に菌体が認められます)。フェノール/クロロホルム抽出を実施してください。・ 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。 |

[8] 参考文献

1. 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)
2. Li, X., Zhao, X., Fang, Y., Jiang, X., Duong, T., Fan, C., Huang, C.C., Kain, S.R. *J. Biol. Chem.* **273**, 34970-34975(1998)
3. Andrew G.B., Joanna B., Cameron S.O., and Peter N.C. *Plasmid*, **44**, 173-182(2000)

[9] 関連商品

●クローニング

| 品名 | 包装 | Code No. |
|---|------------|----------|
| High Fidelity PCR 用酵素 KOD -Plus- | 200 U | KOD-201 |
| High Fidelity PCR 用酵素 KOD -Plus- Ver.2 | 200 U | KOD-211 |
| Taq ベースのブレンド型 PCR 用酵素 Blend Taq[®] | 250 U | BTQ-101 |
| Taq ベースのブレンド型 PCR 用酵素 (Hot start 対応) Blend Taq[®] -Plus- | 250 U | BTQ-201 |
| 簡単ライゲーション Ligation high | 50 回用 | LGK-101 |
| コンピテントセル Competent high DH5 α | 0.1ml×10 本 | DNA-903 |

●アッセイ

| | | |
|--|-------|---------|
| <i>in vitro</i> アッセイ用発光試薬 Emerald Luc Luciferase Assay Reagent Neo | 10ml | ELA-301 |
| <i>in vitro</i> アッセイ用細胞溶解剤 Emerald Luc Lysis Solution | 100ml | ELA-201 |
| <i>in vivo</i> アッセイ用試薬 D-luciferin (カリウム塩) | 20 mg | MRL-101 |

●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 |
| Tripluc [®] システム用 1 液アッセイ試薬 Tripluc Luciferase Assay Reagent | 10ml 10ml×5 | MRA-301 MRA-301X5 |



【製造・販売元】

ー納期・注文に関するお問い合わせー

東洋紡株式会社 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

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部 (東京)
〒104-8345 東京都中央区京橋一丁目17番10号 住友商事京橋ビル
TEL 03-6887-8819 FAX 03-6887-8951
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

ー製品の内容・技術に関するお問い合わせー

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>