

# 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.

Bioproducts Sales and Marketing Department

OSAKA JAPAN

**TOYOBO**

## －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になれます。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)。

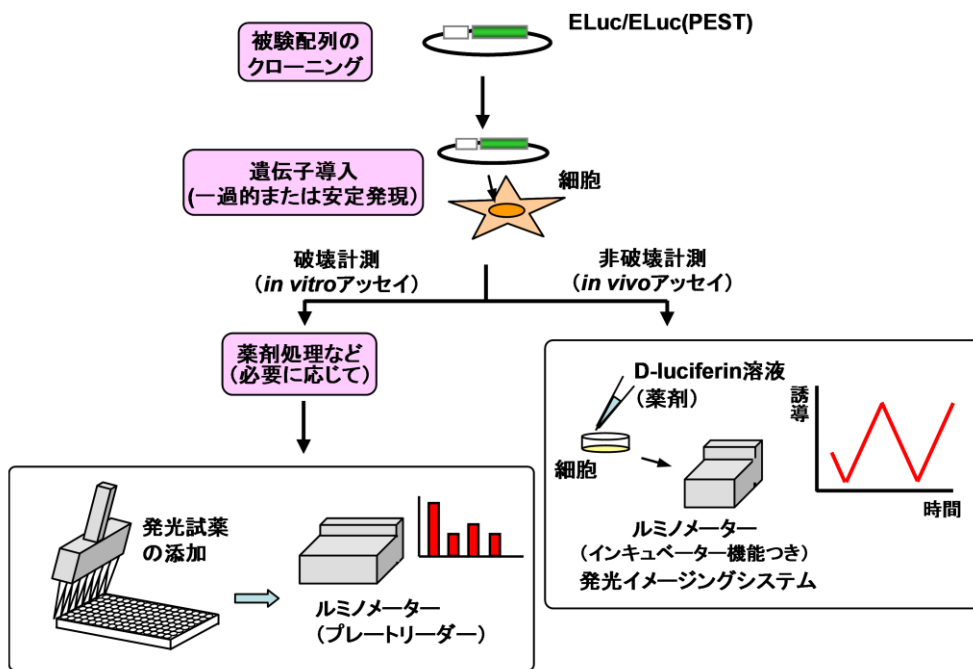


図 1. リポーターアッセイの実験フロー

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になれます。

Emerald Luc システム *in vitro* アッセイ用試薬

品名	サイズ(*)	Code No.
<b>Emerald Luc Luciferase Assay Reagent Neo</b>	10mL × 1 本	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.
<b>Emerald Luc Lysis Solution</b>	100mL × 1 本	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 <b>pELuc-test</b>	10µg × 1 本	ELV-101
Emerald Luc-Short life タイプ-プロモーター挿入用ベクター <b>pELuc(PEST)-test</b>	10µg × 1 本	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)。

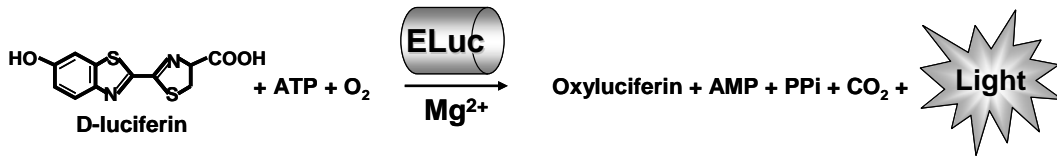


図 2. Emerald Luc による発光反応

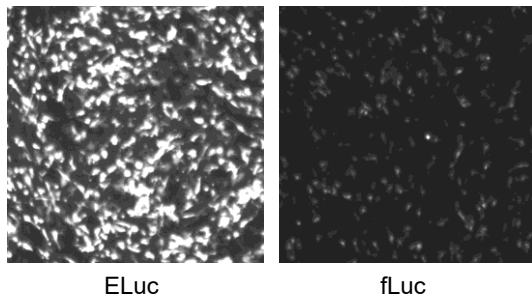


図 3. 細胞の発光像

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。

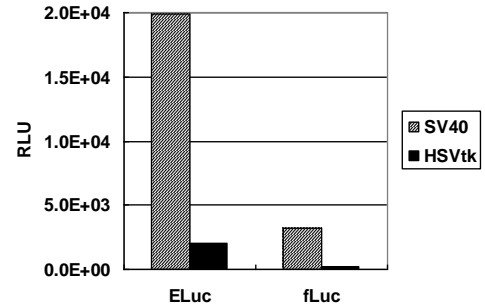
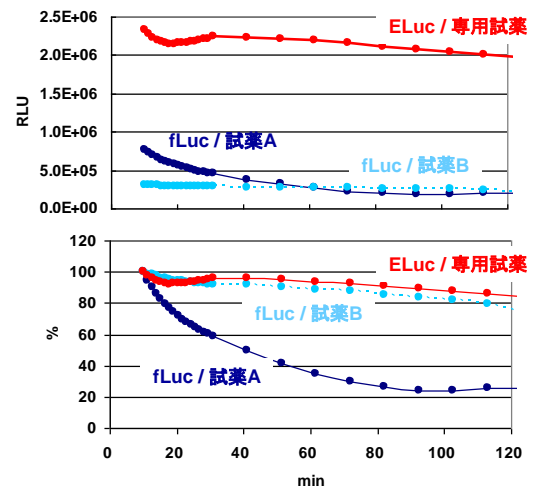


図 4. 生細胞中での発光量比較

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)

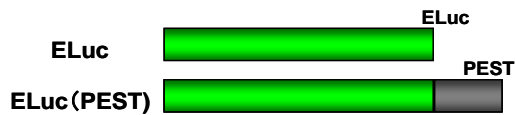


図 7. Emerald Luc 及び Short life タイプの細胞内安定性

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。

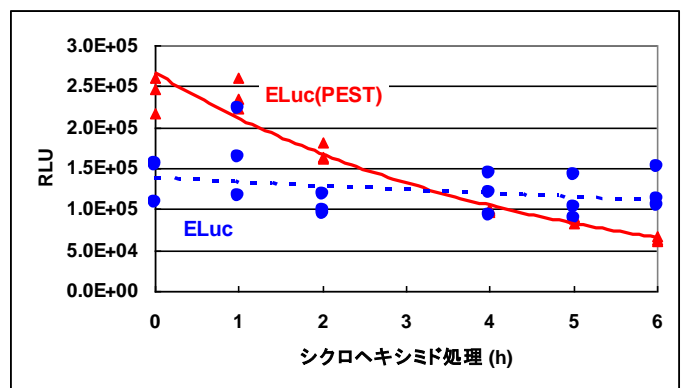
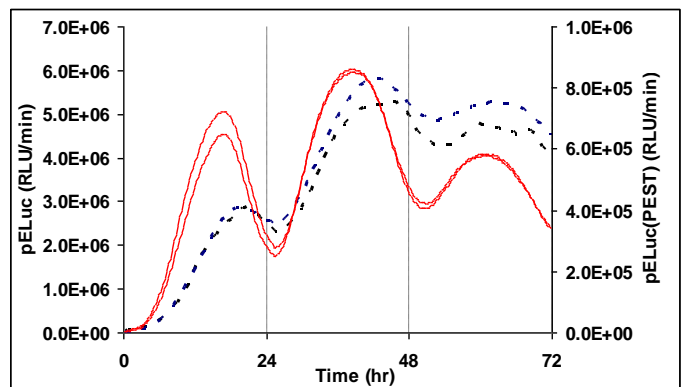


図 8. 概日時計遺伝子の転写変動解析

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增大します。

### **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)。

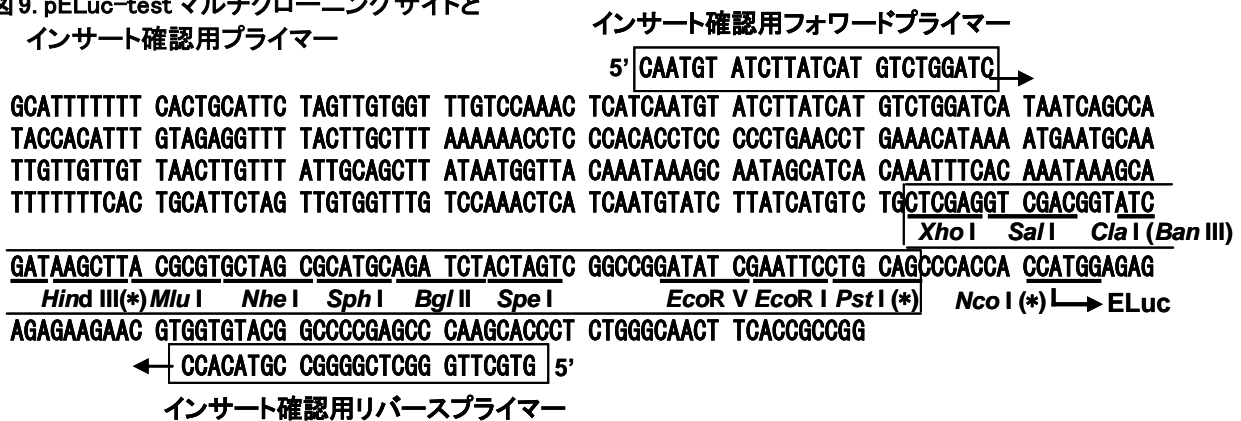
## [4] 哺乳類細胞におけるアッセイ方法の概略

### 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)のご使用をお勧めいたします。

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勧めいたします。

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勧めできません。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 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)

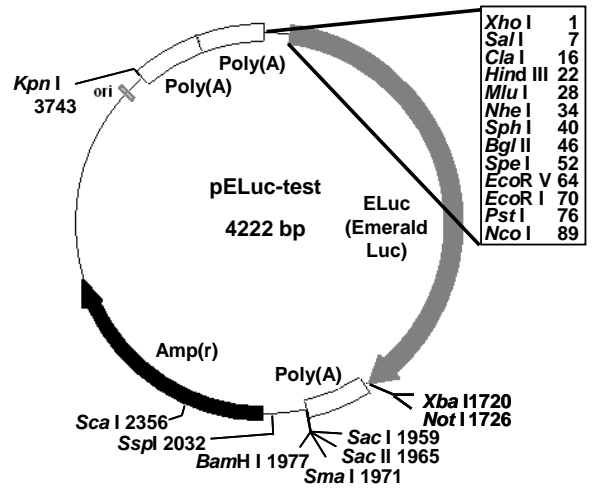
調べたい条件で細胞をインキュベートした後、細胞溶解・発光反応を行う Emerald Luc Luciferase Assay Reagent Neo(Code No. ELA-301)を培地と等量添加します。10 分間インキュベートした後、発光をルミノメーターで検出します。生細胞計測に比べ、発光強度の高い測定が可能です。



## [5] ベクターマップ及び配列情報

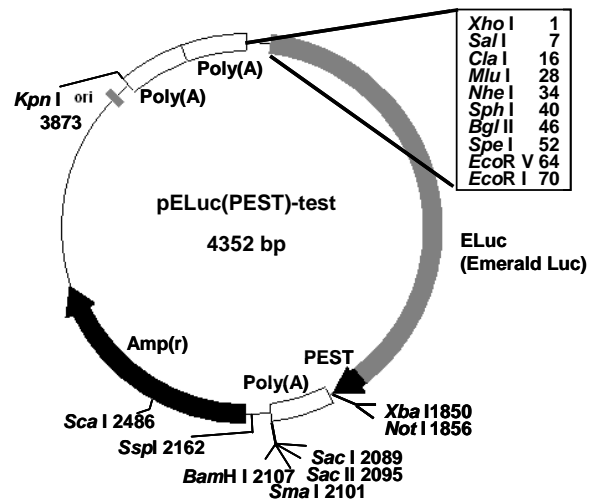
### (1) pELuc -test

pELuc-test	
Multiple cloning region	1-89
Emerald Luc gene (ELuc)	91-1719
SV40 late poly(A) signal	1733-1958
$\beta$ -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
$\beta$ -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勧めできません。

## [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 acccgggcg
161 agatgctgta caacgctctg cacaagcact cccacatccc ccaggccatc ctggacgtga tgggcaacga gtccctttcc
241 taccaggagt tcttcgacac tactgtgaag ctgggccaga gcctccagaa ctgtggctac aagatgaac atgtcgtgtc
321 gatctgtgca gagaacaaca agagattctt catccccatc atctccgctt ggtacatcgg catggtggtg gccctgtgta
401 acgaggacta tatcccagac gagctgtgta aagtgaccgg catctccaag ccgatcctgg tctcaccac taggaagatc
481 ctgcctaagg ttttgagggt taaagacaga accaactaca taaaggaggat catcactctg gactctgaag agaacctgct
561 gggctgcgag agcctgcaca acttcatgtc caggctactc gacaacaacc tcaaacatt caagcctctg cactacgacc
641 ctgtggacca gtagccgcc atcctgtgct cctccggcac aaccggcctg cctaaaggcg ttagtcagac ccacaggaac
721 atctgtgtga gactcacaca cgcactgtac ccagagtgg gtacacaact catccccggc gtatocgtgc tggcctacct
801 gccattcttc caagccttgc gcttcagtat caacctgggc tatttctatg tgggctgag agtgggtgat ctccgaaggt
881 ttaaccagga ggtgttctcg aaggccatcc aggactacga ggtgaggagc gtgatcaacg ttccctccac aatcctgttc
961 ctgtccaaga gccctctggt ggacaagtac gacctatcca ccctggcgga gctgtgctgt ggagccgctc ctctggcgaa
1041 ggaggtggcc gagatcgccg tgaagaggct gaacctgccca gggatacggg tggctacgg tctaacagag tctacctccg
1121 ccaacatcca tactctgcac aacgagttca agtccggctc cctgggcaag gtgacacctt acatggccgc caagatcatc
1201 gacaggaaca ccggcgaggc cctgggtcca aaccagggtg gcgagctgtg catctgggga cctatggtaa caaaaggcta
1281 tgtgaacaac ccacaggcta ctaaggaggc catcgacgac gacggctggc tgcaactctg cgaacttggc tactacgacg
1361 aggacgagta ttctacatc gtggaccggt acaaggagct gatcaaatc aagggtatc aggtgcccc tgtggagctg
1441 gaggagatcc tccttcagca cccaggcatc agggacgtgg ccgtctgtgg tatccctgac atcgaggccg gcgagctgcc
1521 agccggcttc gtggtgaagc agccggcgc ccaactcacc gctaaggagg tgtacgactt cctggcccag aggggtgtctc
1601 actccaagta cctgaggggc ggcgtaaggt tcgtggactc tatcccagg aacgtgacag gcaagattag tcgaaaagag
1681 ctgagggagg cctgatgga gaaggcttct aagctgtaat ctagagcggc cgcccagaca tgataagata cattgatgag
1761 ttggacaaa ccacaactag aatgcagtga aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt tatttgtaac
1841 cattataagc tgcaataaac aagttaaca caacaattgc attcatttta tgtttcaggt tcagggggag gtgtgggagg

```

1921 ttttttaag caagtaaac ctctacaaat gtggtatgga gctcccggg cccgggggat cctcaaatat gtatccgctc  
2001 atgagacaat aacctgata aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtccgctc  
2081 tattcccttt ttgcgcat tttgocctcc tgttttggct caccagaaa cgttggtgaa agtaaaagat gctgaagatc  
2161 agttgggtgc acgagtggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gtttccgcc cgaagaacgt  
2241 tttccaatga tgagcacttt taaagtctg ctatgtggcg cggattatc ccgattgac gccgggcaag agcaactcgg  
2321 tcgccgata cactattctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag  
2401 taagagaatt atgcagtgc gccataacca tgagtataa cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg  
2481 aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc  
2561 cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggogaactac  
2641 ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga ggcgataaa gttgcaggac cacttctgcg ctccggcctt  
2721 ccggctggct ggtttattgc tgataaatct ggagccgggt agcgtgggtc tcggcgtatc attgcagcac tggggccaga  
2801 tgtaagccc tcccgatcgc tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgcgtg  
2881 agatagggtc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagttac tcatatatac ttagattga tttaaaactt  
2961 catttttaat taaaaggat ctaggtgaag atcctttttg ataatctcat gacaaaatc cctaacgtg agttttcgtt  
3041 cactgagcg tcagaccocg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc cttttttct gcgctaac tgctgcttgc  
3121 aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc ttttccgaa ggtaactggc  
3201 ttcagcagag cgcagatacc aaatactggt cttctagtgt agccgtagtt agccaccac tcaagaact ctgtagcacc  
3281 gcctacatac ctgcctctgc taatcctggt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttgact  
3361 caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg  
3441 acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcggcac gcttcccga gggagaaagg cggacaggta  
3521 tccggttaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttcag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtctg  
3601 togggttccg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca gggggcgga gcctatgga aaacgccagc  
3681 aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcggtaccga tcataatcag  
3761 cataccaca tttgtagagg tttacttgc tttaaaaaac ctcccacacc tcccctgaa cctgaaacat aaaaatgatg  
3841 caattgttgt ttttaacttg tttattgcag cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataa  
3921 gcattttttt cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctggatca taatcagcca  
4001 taccacattt gtgaggttt tacttgcttt aaaaaacctc ccacacctcc cctgaacct gaacataa atgaatgca  
4081 ttgttgtgt taacttgtt attgcagctt ataatggtta caaataaagc aatagcatca caaatttcc aaataaagca  
4161 ttttttcac tgcattctag ttgtggtttg tccaaactca tcaatgtatc ttatcatgct 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>San</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 caacgctctg cacaagcact cccacatccc ccaggccatc ctggacgtga tgggcaacga gtccctttcc
241 taccaggagt tcttcgacac tactgtgaag ctgggccaga gcctccagaa ctgtggctac aagatgaacg atgtcgtgtc
321 gatctgtgca gagaacaaca agagattctt catccccatc atctccgctt ggtacatcgg catggtggtg gccctgtgta
401 acgaggacta tatcccagac gagctgtgta aagtgaccgg catctccaag ccgatcctgg tcttcaccac taggaagatc
481 ctgcctaagg ttttgagggt taaagacaga accaactaca taaagaggat catcactactg gactctgaag agaacctgct
561 gggctgcgag agcctgcaca acttcatgtc caggctactc gacaacaacc tcaaacattt caagcctctg cactacgacc
641 ctgtggacca gtagccgcc atcctgtgct cctccggcac aaccggcctg cctaaaggcg tgatgcagac ccacaggaac
721 atctgtgtga gactcacaca cgcactgtac cccagagtgg gtacacaact catccccggc gtatccgtgc tggcctacct
801 gccattcttc caagccttcc gcttcagtat caacctgggc tatttctatg tgggcctgag agtgggtgat ctccgaaggt
881 ttaaccagga ggtgttctcg aaggccatcc aggactacga ggtgaggagc gtgatcaacg ttccctccac aatcctgttc
961 ctgtccaaga gcctctgtgt ggacaagtac gacctatcca ccctggcgga gctgtgctgt ggagccgctc ctctggcgaa
1041 ggaggtggcc gagatcgccg tgaagaggct gaacctgcca gggatacggg tggctacggg tctaacagag tctaactccg
1121 ccaacatcca tactctgcac aacgagttca agtccggctc cctgggcaag gtgacacctt acatggccgc caagatcatc
1201 gacaggaaca ccggcgaggc cctgggtcca aaccagggtg gogagctgtg catctgggga cctatggtaa caaaaggcta
1281 tgtgaacaac ccacaggcta ctaaggaggc catcgcagac gacggctggc tgcactctgg cgaactcggc tactacgacg
1361 aggacgagta tttctacatc gtggaccggt acaaggagct gatcaaatac aagggctatc aggtcgcgcc tgtggagctg
1441 gaggagatcc tcttcagca cccaggcatc agggcagctg ccgtcgtggg tatccctgac atcaggcccg gcgagctgcc
1521 agccggcttc gtggtgaagc agcccgccgc ccaactcacc gctaaggagg tgtacgactt cctggcccag aggggtgtctc
1601 actccaagta cctgaggggc ggcgtaaggt tcgtggactc tatcccagg aacgtgacag gcaagattag tcgaaaagag
1681 ctgagggagg ccctgatgga gaaggcttct aagcttagcc atggcttccc gccggagggtg gaggagcagg ctgtcggcac
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 tgtttcagggt tcagggggag gtgtgggagg ttttttaag caagtaaac ctctacaat
2081 gtggtatgga gctcccggc cccgggggat cctcaaatat gtatccgctc atgagacaat aacctgata aatgcttcaa
2161 taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgcctt tattcccttt tttggcgcat tttgcttcc
2241 tgtttttgct caccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtggtg tacatogaac
2321 tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc cgaagaactt tttccaatga tgagcacttt taaagttctg
2401 ctatgtggcg cgttattatc ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgata cactattctc agaatgactt
2481 ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgtc gccataacca
2561 tgagtgataa cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg
2641 ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc catacacaac gacgagcgtg acaccacgat
2721 gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcgaaactc ttactctagc ttccggcaa caattaatag
2801 actggatgga ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctccggcctt ccggctggct ggtttattgc tgataaatct
2881 ggagccgggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga tggtaaagccc tccgtatcgc tagttatcta
2961 cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgtcg agataggtgc ctactgattt aagcattggt
3041 aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac ttttagattga tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat ctaggtgaag
3121 atcctttttg ataatctcat gaccaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt cactgagcg tcagaccccg tagaaaagat
3201 caaaggatct tcttgagatc cttttttctt gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg
3281 tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactggt
3361 cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctgcctctgc taatcctggt
3441 accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc
3521 ggtcgggctg aacgggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt
3601 gagctatgag aaagcggcac gcttccgaa gggagaaagg cggacaggta tcgggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga
3681 gcgcacgagg gagcttcag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc
3761 gattttttgt atgctcgtca gggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt
3841 tgctggcctt ttgctcacat gttctttctt gcggtaccga tcataatcag ccataaccaca tttgtagagg ttttacttgc

```

3921 tttaaaaaac ctcccacacc tcccctgaa cctgaaacat aaaatgaatg caattggtgt tgtaacttg tttattgcag  
4001 cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaataaaa gcattttttt cactgcattc tagttgtggt  
4081 ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctggatca taatcagcca taccacattt gtagaggttt tacttgcttt  
4161 aaaaaacctc ccacacctcc ccctgaacct gaaacataaa atgaatgcaa ttgttgtgt taacttgttt attgcagctt  
4241 ataatggtta caataaagc 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"><li>・ PCR を 2 ステップサイクルにする。</li><li>・ PCR の Denature ステップを 98°C、10 秒にする。</li><li>・ 5%程度の DMSO を PCR 反応液に添加する。</li></ul>
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"><li>・ もともと発現の低いプロモーターの可能性ががあります。</li><li>・ 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。</li><li>・ 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。</li><li>・ 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。</li></ul>

## [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 <b>KOD -Plus-</b>	200 U × 1 本	KOD-201
High Fidelity PCR 用酵素 <b>KOD -Plus- Ver.2</b>	200 U × 1 本	KOD-211
Taq ベースのブレンド型 PCR 用酵素 <b>Blend Taq®</b>	250 U × 1 本	BTQ-101
Taq ベースのブレンド型 PCR 用酵素 (Hot start 対応) <b>Blend Taq® -Plus-</b>	250 U × 1 本	BTQ-201
簡単ライゲーション <b>Ligation high</b>	50 回用	LGK-101
コンピテントセル <b>Competent high DH5 α</b>	0.1mL × 10 本	DNA-903

### ●アッセイ

<i>in vitro</i> アッセイ用発光試薬 <b>Emerald Luc Luciferase Assay Reagent Neo</b>	10mL × 1 本	ELA-301
<i>in vitro</i> アッセイ用細胞溶解剤 <b>Emerald Luc Lysis Solution</b>	100mL × 1 本	ELA-201

### ●多色レポーターアッセイ

<b>MultiReporter Assay System -Tripluc®-</b> プロモーター挿入用ベクター <b>pSLG-test</b>	20 μg × 1 本	MRV-101
<b>MultiReporter Assay System -Tripluc®-</b> プロモーター挿入用ベクター <b>pSLO-test</b>	20 μg × 1 本	MRV-102
<b>MultiReporter Assay System -Tripluc®-</b> プロモーター挿入用ベクター <b>pSLR-test</b>	20 μg × 1 本	MRV-103
<b>MultiReporter Assay System -Tripluc®-</b> SV40 コントロールベクター <b>pSLG-SV40 control</b>	20 μg × 1 本	MRV-201
<b>MultiReporter Assay System -Tripluc®-</b> SV40 コントロールベクター <b>pSLO-SV40 control</b>	20 μg × 1 本	MRV-202
<b>MultiReporter Assay System -Tripluc®-</b> SV40 コントロールベクター <b>pSLR-SV40 control</b>	20 μg × 1 本	MRV-203
<b>MultiReporter Assay System -Tripluc®-</b> HSVtk コントロールベクター <b>pSLG-HSVtk control</b>	20 μg × 1 本	MRV-301
Tripluc®システム用 1 液アッセイ試薬 <b>Tripluc Luciferase Assay Reagent</b>	10mL × 1 本 (10mL × 1 本) × 5	MRA-301 MRA-301X5

# TOYOBO

## 【製造・販売元】

—価格・在庫に関するお問い合わせ—

東洋紡株式会社 バイオプロダクト営業部 (大阪)  
〒530-0001 大阪府大阪市北区梅田一丁目13番1号  
大阪梅田ツインタワーズ・サウス  
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833  
E-mail : order\_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社 バイオプロダクト営業部 (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

—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 (土日祝日、休日を除く)  
E-mail : tech\_osaka@toyobo.jp  
[URL] <https://lifescience.toyobo.co.jp/>