

Cell Based Assay Guide

細胞内マーカーとレポーターの効率的な測定



Contents :

• イントロダクション	2
• 細胞内在マーカー測定	5
・ 細胞増殖 & 毒性	6
・ アポトーシス	11
・ プロテアソーム	15
・ グルタチオン	16
・ P450	17
・ HDAC	18
・ cAMP	19
• 細胞外来マーカー測定 (ルシフェラーゼレポーター解析)	21
・ in vitro エンドポイントアッセイ	22
・ in vitro リアルタイムアッセイ	25
・ in vivo イメージング	26
・ レポーターベクター	27
- シグナル伝達	28
- タンパク質間相互作用	30
- RNAi	30
・ トランスフェクション	31

2nd Edition

細胞を用いたバイオアッセイ

細胞を用いた生理反応・応答の解析は、生命科学を理解する上で不可欠であり、分子レベルでの研究成果を個体レベルに応用する上で橋渡しとなる重要なステージでもあります。また、細胞系の反応から本質的に生体内の反応を予測することが可能であることから、セルベースアッセイは創薬プログラムでも多く導入されています。

多様な細胞株の確立や培養技術の発達により、細胞を用いたアッセイ系は比較的容易になり、動物個体を用いた実験手法に比べて処理能力や操作性にも優れます。遺伝子の解析によりもたらされた膨大なデータを、いかに迅速に生体レベルまで還元することができるかがこれからの研究課題になってきており、網羅的な研究を行う上でスピードアップしたセルベースアッセイが求められます。プロメガでは、これらバイオアッセイに最適なルシフェラーゼによる生物発光を中心とした高感度で簡便なアッセイ試薬を開発すると同時に、より生物学的に有意な情報が得られる様々なシステム構築を目指しています。

1) 細胞内在マーカーの測定：細胞に内在する酵素や代謝物などを測定し、細胞の状態を調べることができます。LDHやDCP* (9ページ参照) は死細胞 (細胞毒性試験)、NADH, ATPやLCP* (9ページ参照) は生存細胞 (細胞生存試験)、カスパーゼはアポトーシス、GSHは酸化ストレスなどの指標として測定されます。また、cAMPなどのシグナル伝達物質をモニタリングすることもできます。

選択ガイド5ページ参照

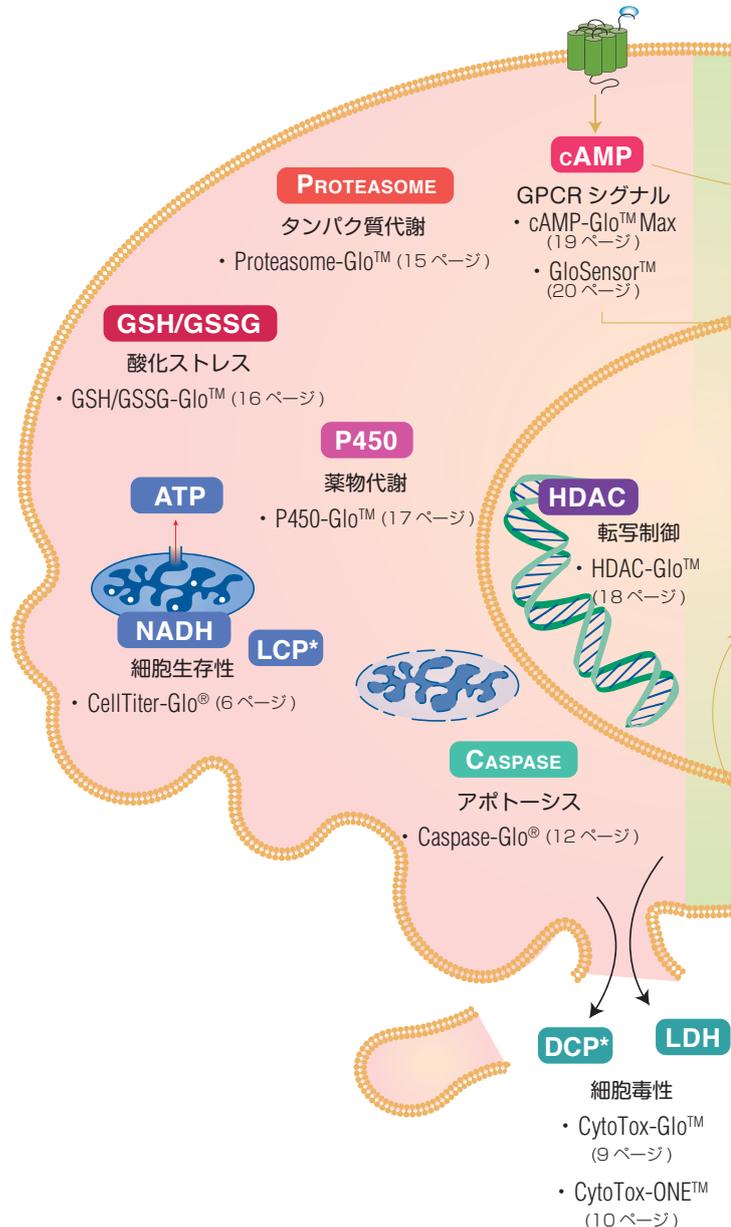
2) 細胞外来マーカーの測定、観察：測定・検出が容易な外来性タンパク質をコードする遺伝子を細胞内に導入して、細胞内事象の変化をその発現量あるいは動態として検知することができます。このレポーター遺伝子に細胞内現象に応答する制御配列を付加して細胞内の応答シグナルをレポーター酵素の発現量に変換して測定するレポーターアッセイはシグナル伝達の研究などに広く利用されています。また、ルシフェラーゼレポーター酵素から生じる光は、細胞や生物個体を生きたまま観察し、発現の様子をイメージングするのもに適しています。特にルシフェラーゼを用いた動物のイメージング実験は、比較的感度が高く低侵襲性であることから近年注目を集めています。

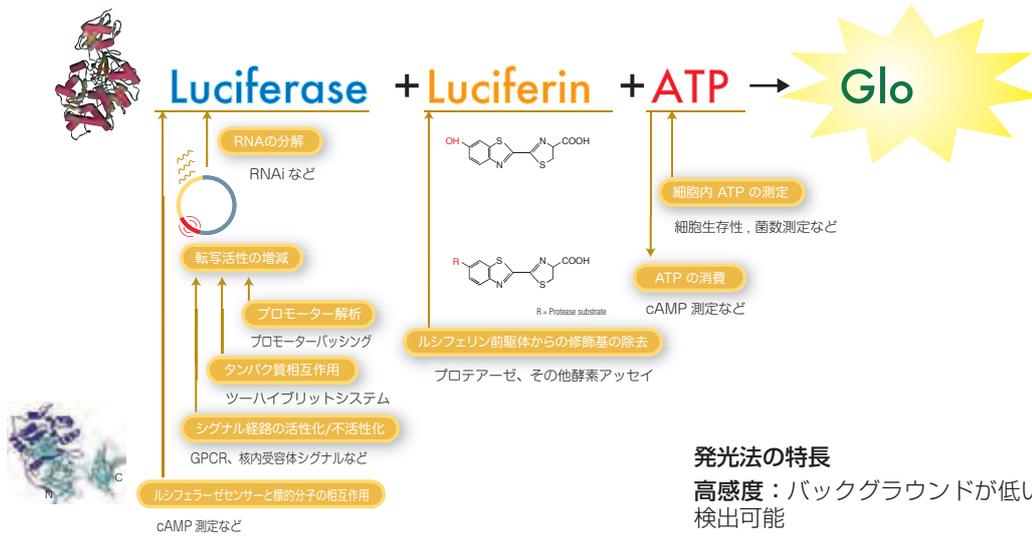
選択ガイド21ページ (試薬)、29ページ (ベクター) 参照

高感度なルシフェラーゼ発光とマルチプレックスを可能にする蛍光

発光測定および蛍光測定はそれぞれ特長が異なり、お互いを組み合わせることで細胞ベースのアッセイの幅が広がります。発光法は蛍光法よりも感度が高く、バックグラウンドが低いいため、複雑な生体環境を有する培養細胞を用いたアッセイ系には最適です。また、プロメガの発光技術によりルシフェラーゼ発光反応を応用した数多くの発光アッセイシステムがご利用いただけるようになりました。一方、蛍光法は感度は劣るものの発光法とは発光機構が異なり、波長の違いによりシグナルを分けることができるため、同一サンプルより複数項目についてのマルチアッセイに適しています。弊社は安定性や頑健性に関する特殊な発光技術を有しており、他のアッセイケミストリーとの相性に優れているため発光法と蛍光法を組み合わせたマルチアッセイを容易にデザインすることができます。同一のサンプルからより多くの情報を少スケール (>96ウェル形式) で取得することができ、多項目のハイスループットアッセイを行うことができるため非常に効率的です。

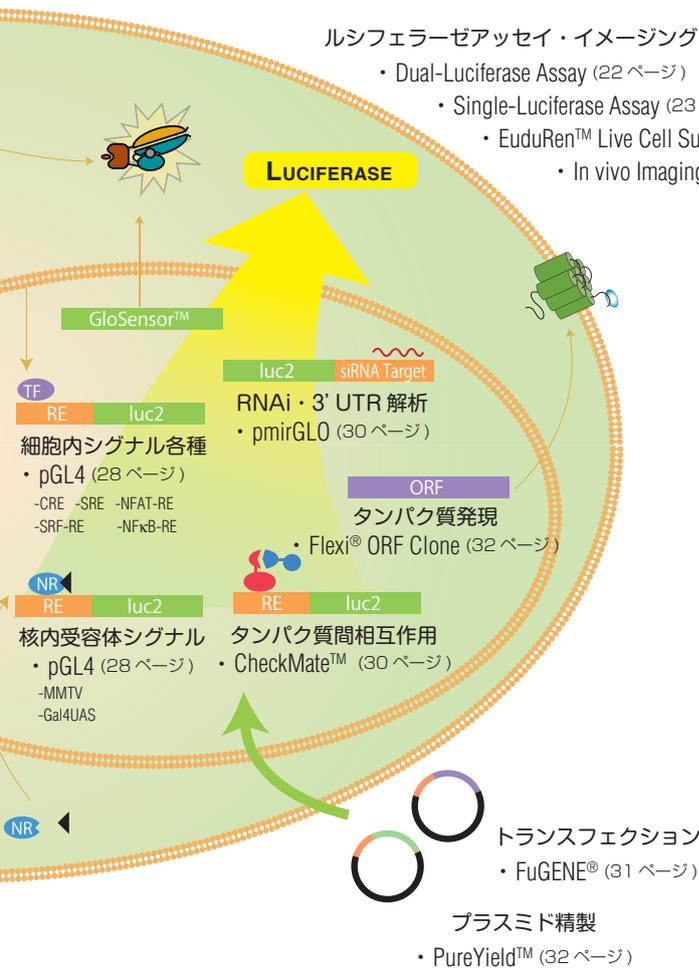
Native Cell Analysis





ルシフェラーゼ反応を応用した様々な発光アッセイ

Recombinant Cell Analysis



* LCP : Live Cell Protease, DCP : Dead Cell Protease (9 ページ参照)

発光法の特長

高感度：バックグラウンドが低いため微弱なシグナルでも検出可能

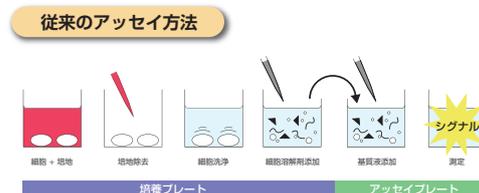
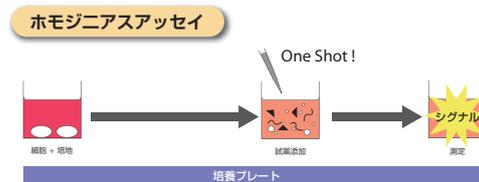
ダイナミックレンジ：分析対象物濃度で 6 ~ 8 桁の直線性を有し、最適化も容易

簡便：検出装置にフィルターの装着や測定レンジの調整が不要

迅速：発光シグナルは反応開始後、迅速に定常状態になるため、蛍光法のように蛍光産物の蓄積を待つ必要がありません

ホモジニアスアッセイ

多くのプロメガのアッセイシステムは、簡便な操作（試薬添加 → 混和 → 測定）でアッセイが行えるホモジニアスフォーマットを採用しており、培地の除去や細胞の洗浄を行わずに培養ウェルでそのままアッセイを実施することができます。これは、採用されているアッセイケミストリーが、培地や血清、界面活性剤などに影響を受けにくい性質を持つために実現するものです。マルチアッセイに使用する試薬を随時添加するだけでそれぞれのシグナルが得られるため、自動化も容易です。



プロメガのルシフェラーゼ発光技術

発光ケミストリの進化

生体のエネルギー源であるATP（および酸素）を発光シグナル（光子）に変換するルシフェラーゼは、その希少性から殆どの生物においてバックグラウンドが実質的に無く、さらにエネルギー変換効率の高さや光源を不要とする特性により長く生物学実験で利用されています。しかし、急激に消光する特性やルシフェラーゼタンパク質の不安定性（易熱性）などのネイティブタンパク質の本来の性質により、アプリケーションは限られていました。プロメガは発光時間の延長や反応系の安定化を図ることにより、これらの問題を解決することで、より使いやすく、幅広い用途に使えるルシフェラーゼ試薬を開発してきました。

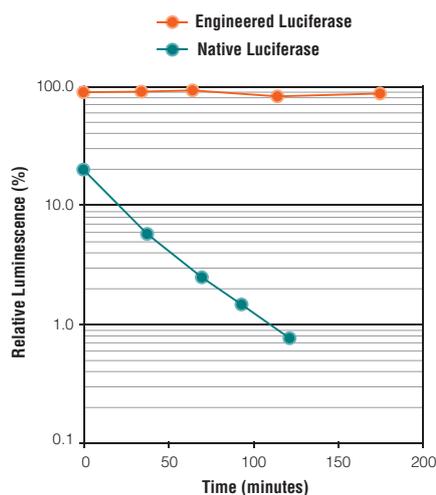
安定性：界面活性剤や熱に安定なUltra-Glo™ ルシフェラーゼ（ルシフェリンおよびATPの測定試薬に含まれる）や低pHや阻害物質に寛容性のあるフツ化5'-ルシフェリン（ONE-Glo™に含まれる）の開発など。

簡便性：複数試薬のマスターミックス化や培地・生体物質の阻害効果に対する抵抗性により“添加-混和-測定”のシンプル操作を実現（ホモジニアスアッセイ）

発光時間の延長：反応時間の制御により発光が数時間安定

マルチアッセイ：発光測定と蛍光測定を1つの反応系で実施可能

アプリケーションの拡大：ルシフェリンやセレンテラジンの修飾により様々な酵素の測定や生細胞アッセイ、In Vivo イメージングを実現



ネイティブルシフェラーゼと Ultra-Glo™ ルシフェラーゼの 0.002% SDS に対する感受性の違い

Ultra-Glo™ Luciferase の優位性

頑健な発光アッセイ試薬のために開発された Ultra-Glo™ ルシフェラーゼには 27 カ所の変異が導入されており、様々なアッセイ条件下でも活性を維持し、アッセイに優れた特性を与えます

- 熱安定性の増加
- アッセイ試薬成分の親水性結合に対する抵抗性
- より頑健で安定なアッセイ
- 擬陰性や擬陽性の低減

レポーターベクターの改良

レポーターアッセイで細胞内に導入されるレポーターベクターは、細胞内のシグナルを捕えてレポーター酵素の発現量に反映させる重要な役割を担っています。正確なレポーターアッセイを行うには応答性に優れ、ノイズの少ないベクターを使用する必要があります。従来のプラスミドベクターにはコンセンサスな転写因子結合サイトが数多く含まれており、標的以外のシグナルに反応して変則的な発現が認められることがありました（Off-Target effect）。新しいpGL4シリーズのベクターからはコンセンサス配列の多くが除去され、信頼性のあるレポーターングを実現します。また、ルシフェラーゼ遺伝子にタンパク質分解配列を付加することにより、細胞内のシグナルに対して迅速、高感度に反応するすぐれた特性を獲得しました。詳細については27ページをご覧ください。

細胞内在マーカー検出システム 選択ガイド

製品名	マーカー	検出シグナル	基質 / 測定原理	検出方法	検出までの時間	感度	ページ
細胞生存性試験							
CellTiter-Glo® Assay	ATP (エネルギー合成能)	発光	Luciferin	定量 (細胞溶解)	10 分間	細胞 10 個 *	6
CellTiter-Fluor™ Assay	LCP	蛍光 (400 _{Ex} /505 _{Em})	Gly-Phe-AFC	定量 (生細胞)	0.5-3 時間	細胞 40 個	7
CellTiter-Blue® Assay	NADH (還元能)	蛍光 (560 _{Ex} /590 _{Em}) 発色 (570nm)	Resazurin	定量 (生細胞)	1-4 時間	細胞 50 個 *	8
CellTiter-96® AQueous One Solution Assay	NADH (還元能)	発色 (490nm)	MTS tetrazolium	定量 (生細胞)	1-4 時間	細胞 200 個 *	8
細胞毒性試験							
CytoTox-Glo™ Assay	DCP	発光	Ala-Ala-Phe-aminoluciferin	定量 (生細胞)	15 分間	細胞 10 個	9
CytoTox-Fluor™ Assay	DCP	蛍光 (485 _{Ex} /520 _{Em})	bis-Ala-Ala-Phe-rhodamine 110 (R110)	定量 (生細胞)	0.5-3 時間	細胞 10 個	32
CytoTox-ONE™ Assay	LDH	蛍光 (560 _{Ex} /590 _{Em})	Resorufin/Diaphorase	定量 (生細胞)	10 分間	細胞 200 個 *	10
CytoTox 96® Cytotoxicity Assay	LDH	発色 (490nm)	INT/Diaphorase	定量 (生細胞)	30 分間	細胞 1000-2000 個	10
MultiTox-Fluor Assay	LCP および DCP	蛍光 (400 _{Ex} /505 _{Em}) / (485 _{Ex} /520 _{Em})	bis-AAF-R110/ Gly-Phe-AFC	定量 (生細胞)	0.5-3 時間	生細胞 40 個 / 死細胞 10 個	11
MultiTox-Glo Assay	LCP および DCP	蛍光 (400 _{Ex} /505 _{Em}) / 発光	Gly-Phe-AFC/Ala-Ala-Phe-aminoluciferin	定量 (生細胞)	30 分間	生細胞 40 個 / 死細胞 10 個	11
ApoLive-Glo™ Multiplex Assay 	LCP および Caspase-3/7	蛍光 (400 _{Ex} /505 _{Em}) / 発光	Gly-Phe-AFC/Z-DEVD-aminoluciferin	定量 (細胞溶解)	0.5-3 時間	細胞数十個	11
ApoTox-Glo™ Triplex Assay	LCP、DCP および Caspase-3/7	蛍光 (400 _{Ex} /505 _{Em}) / (485 _{Ex} /520 _{Em}) / 発光	bis-AAF-R110/Gly-Phe-AFC/ Z-DEVD-aminoluciferin	定量 (細胞溶解)	0.5-3 時間	細胞数十個	11
アポトーシス解析							
Caspase-Glo® Assays	Caspase-3/7 Caspase-8 Caspase-9	発光	Z-DEVD-aminoluciferin (for 3/7) Z-LETD-aminoluciferin (for 8) Z-LEHD-aminoluciferin (for 9)	定量 (細胞溶解)	30 分間	細胞 20 個 * 細胞 1000 個 細胞 1500 個	12
Apo-ONE® Caspase-3/7 Assay	Caspase-3/7	蛍光 (499 _{Ex} /521 _{Em})	Z-DEVD-R110	定量 (細胞溶解)	1-18 時間	細胞 200 個 *	13
DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System	DNA Fragmentation	蛍光	fluorescein-12-dUTP (TdT 反応)	観察 (蛍光顕微鏡 / フローサイトメータ)	—	—	13
DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System	DNA Fragmentation	発色	Biotinylated nucleotide, Streptavidin HRP, DAB	観察 (顕微鏡)	—	—	13
CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker	Caspases	蛍光	FITC-VAD-FMK	観察 (蛍光顕微鏡 / フローサイトメータ)	—	—	14
Anti-ACTIVE® Caspase-3 pAb	Caspase-3	発色 / 蛍光	ウェスタン、免疫染色	観察	—	—	14
Anti-PARP p85 Fragment pAb	PARP	発色 / 蛍光	免疫染色	観察	—	—	14
VivoGlo™ Caspase-3/7 Substrate	Caspase-3/7	発光	Z-DEVD-aminoluciferin	In Vivo イメージング (CCD)	—	—	26
酸化ストレス解析							
GSH/GSSG-Glo™ Assay 	総グルタチオン、GSSG	発光	Luc-NT	定量 (細胞溶解)	1 時間	細胞 300 個 *	16
GSH-Glo™ Assay	GSH	発光	Luc-NT	定量 (細胞溶解)	1 時間	細胞 300 個 *	16
GPCR シグナル解析							
cAMP-Glo™ Max Assay 	cAMP	発光	プロテインキナーゼAとルシフェラーゼのカップリング反応	定量 (細胞溶解)	30 分間	15 個 (付着細胞)	19
GloSensor™ cAMP Assay	cAMP	発光	バクターより発現したルシフェラーゼセンサーと cAMP との結合によりシグナルを生成	モニタリング (生細胞)	—	—	20
その他							
P450-Glo™ Assays 	CYP1A2, 3A4, 1A1, 2C9, 4A	発光	Luciferin-IPA, Luciferin-1A2, Luciferin-PFBE, Luciferin-CEE, Luciferin-H, Luciferin-4A	定量 (生細胞または細胞溶解)	1-6 時間	—	17
HDAC-Glo™ Assay 	HDAC (class I & II)	発光	HDAC-Glo™ I/II Substrate	定量 (生細胞または細胞溶解)	15-45 分間	—	18
Proteasome-Glo™ Cell-Based Assays 	Proteasome (chymotrypsin-like, trypsin-like, caspase-like activities)	発光	Suc-LLVYaminoluciferin, Z-LRRaminoluciferin, Z-nLPnLDaminoluciferin	定量 (生細胞)	10-15 分間	500 個 (付着細胞)	15

LCP: Live cell Protease, DCP: Dead Live Cell
* 384 ウェル

細胞生存性

ATP

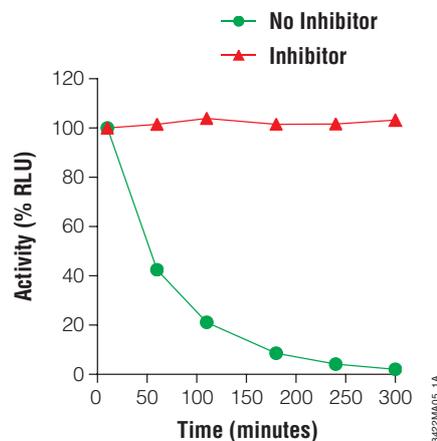
発光

CellTiter-Glo[®] Assay

最も高感度な細胞内ATPをベースとした細胞増殖試験

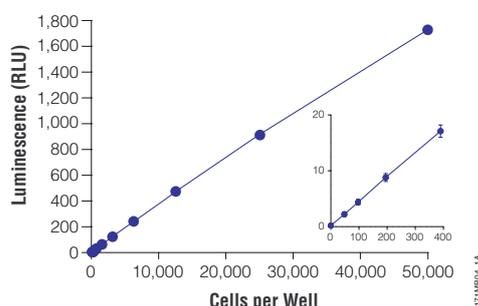
CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assayは、代謝活性のある細胞に由来するATPを定量することで培養中の生存細胞数を測定するワン-ショットタイプの細胞増殖・毒性システムです。マルチプレートのアッセイ用にデザインされており、自動化されたハイスループットスクリーニング (HTS) にも最適です。優れた感度を示すため、発色法では困難な浮遊細胞を用いる場合に威力を発揮します。1種類の試薬を培養細胞 (血清含有) に加えるだけで、培地の除去・細胞の洗浄や複数回のピペティングは不要です。試薬を加えると細胞溶解が始まり、存在するATP量に比例した発光シグナルが生じます。また、この試薬にはATPase阻害剤が含まれ、細胞溶解時にATPの減少を防ぐことができるため、より正確なATP測定が可能です。このシステムで生じる発光は、半減期の長い“グロータイプ” (5時間以上) なのでインジェクターを必要とせず、連続モードあるいはバッチモードの自動化システム両方に適応します。

- ・ **ホモジニアス**：ワン-ショットタイプ (添加→混合→測定) なので他の ATP 測定システムに比べプレートのハンドリングが最小限。
- ・ **迅速**：試薬添加 10 分後にデータが得られます。
- ・ **高感度**：標準的な発色または蛍光定量法に比べ優れた感度。(細胞 10 個 [384 プレート]、細胞 50 個 [96 プレート] を検出)。
- ・ **正確**：発色法・蛍光法より正確な定量性。
- ・ **安定性**：発光が非常に安定 (5 時間以上)。
- ・ **応用性**：様々なマルチプレートに適応し、ルミノメーターあるいは CCD カメラで測定。



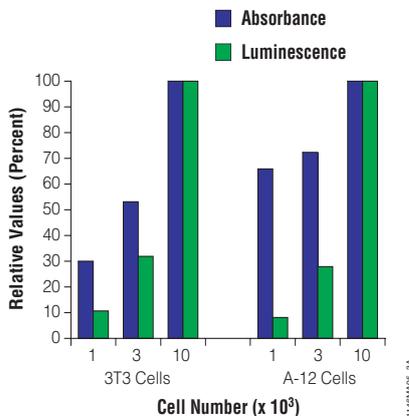
CellTiter-Glo Reagent による ATPase 活性の阻害

10% ウマ血清を含む DME/F-12 (1:1) に懸濁した L929 細胞 (1.5×10^5 cells/ml) から凍結 / 融解により調製したライセートを 2 つのプールに分けて、22°C でインキュベーションした。一方のプールには等量の 50mM HEPES (pH 7.5; no inhibitor) を加え、もう片方には等量の CellTiter-Glo[®] Buffer (inhibitor) を添加した。60 分毎 (計 5 回) に 100 μ l を分取し 5X CellTiter-Glo[®] Substrate を 20 μ l 添加し、混和した。各タイムポイントで測定したサンプル数は 4 つ。



細胞数と発光量の相関関係

CellTiter-Glo[®] Assay で測定した場合、発光量と細胞数には直接的な相関関係が認められる。



CellTiter-Glo Assay と従来法との比較

従来法は細胞内酵素によりテトラゾリウム塩 WST-1 から変換したホルマザン産物を測定。NIH3T3 および A-12 (PARP-1 欠損) を表示量 96 ウェルプレートに播種した (100 μ l)。CellTiter-Glo[®] Reagent (100 μ l) または WST-1 (10 μ l) を添加、混和し、インキュベーションした後に発光または吸光度を測定した。各測定は 4 ウェルずつ行い、細胞を含まないバックグラウンド値は差し引かず計算した。

製品名

サイズ

カタログ番号

価格 (¥)

CellTiter-Glo Assay

アッセイシステム

CellTiter-Glo [®] Luminescent Cell Viability Assay	10ml	G7570	13,000
	10 \times 10ml	G7571	55,000
	100ml	G7572	49,500
	10 \times 100ml	G7573	418,000

・ 10ml は 96 ウェルプレートで 100 ウェル分、384 ウェルプレートで 400 ウェル分。

・ バルク注文については弊社までお問い合わせください。

プロメガ資料： www.promega.co.jp/lit/celltigitlo.html

細胞生存性

LCP

蛍光

CellTiter-Fluor™ Assay

新規なプロテアーゼマーカーを指標とした蛍光細胞増殖試験

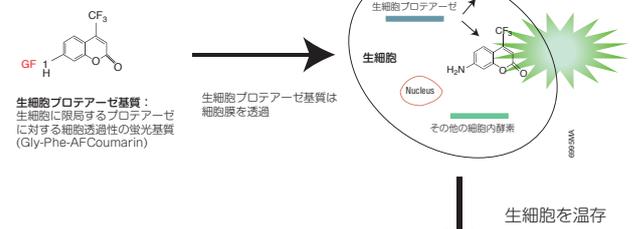
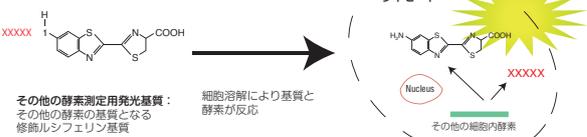
励起波長：400nm

蛍光波長：505nm

生細胞プロテアーゼ（LCP）を指標とした蛍光法による細胞生存性試験薬です。細胞非溶解性で試薬を1種類加えるだけで簡単に細胞数を測定することができます。本法で得られた結果は、確立されている細胞生存性試験法と非常に良く相関します。生細胞プロテアーゼ活性は恒常的なプロテアーゼによるものでインタクトな細胞内に限定されており、細胞透過性の蛍光性ペプチド基質（GF-AFC）を用いて測定します。基質がインタクトな細胞内に入ると、生細胞由来のプロテアーゼ活性により切断され、生細胞数に比例した蛍光シグナルを生じます。この生細胞由来のプロテアーゼは、細胞膜の完全性が失われ、培地に漏出すると不活性化します。本製品は、同一ウェル内で他の測定反応と組み合わせた連続マルチプレックスアッセイが行え、細胞数で補正された正確な値を得ることができます。プロメガの発光アッセイや波長の区別が可能な他の蛍光アッセイと併用することもできます（カスパーゼアッセイ、レポーターアッセイ、他のバイオマーカーを用いた生存性試験など）。

- **1 ウェルからより多くの情報を取得：**プロメガのほとんどの発光アッセイ法を併用したマルチアッセイが可能
- **簡便：**細胞非溶解性で、1種類の試薬を加えるだけの添加-混和-測定プロトコル
- **細胞数による補正：**生細胞数による補正により、ウェル間、プレート間、測定日間での比較が容易になります。

1st: CellTiterFluor™ アッセイ（蛍光）

2nd: その他の細胞内酵素アッセイ（発光）
【オプション】

CellTiter-Fluor™ を用いた典型的なマルチアッセイ例

CellTiter-Fluor™ との組み合わせが可能なその他のアッセイ

組み合わせ可能なアッセイ	追加される測定項目	備考
CytoTox-Fluor™ Assay & Caspase-Glo® 3/7 Assay	細胞毒性（蛍光：Rhodamine 110）、アポトーシス（発光）	32, 12 ページを参照ください。3 種類のアッセイがセットになった ApoTox-Glo™ Triplex Assay もご覧ください（11 ページ）。
Caspase-Glo® 3/7, 8, 9 Assay	アポトーシス（発光）	アポトーシスの進行にともなう細胞生存性の変化を観察（12 ページ）。2 種類のアッセイがセットになった ApoLive-Glo™ Multiplex Assay もご覧ください（11 ページ）。
Apo-ONE® Homogeneous Caspase 3/7 Assay	アポトーシス（蛍光：Rhodamine 110）	アポトーシスの進行にともなう細胞生存性の変化を観察（13 ページ）。
CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay	細胞毒性（蛍光：Rhodamine 110）	32 ページを参照ください。同一ウェルで生細胞と死細胞のレシオメトリックなデータを取得。2 種類のアッセイがセットになった MultiTox-Fluor Multiplex Assay もご覧ください（11 ページ）。
CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay	細胞毒性（発光）	発光で細胞膜の破壊を観察（9 ページ）。同一ウェルで生細胞と死細胞のレシオメトリックなデータを取得。2 種類のアッセイがセットになった MultiTox-Glo Multiplex Assay もご覧ください（11 ページ）。
ONE-Glo™ Luciferase Assay System Bright-Glo™ Luciferase Assay System Steady-Glo™ Luciferase Assay System	レポーターアッセイ（発光）	生存細胞にもとづく遺伝子発現を観察（23 ページ）。2 種類のアッセイがセットになった ONE-Glo™ + Tox Luciferase Reporter and Cell Viability Assay もご覧ください（24 ページ）。
GSH-Glo™ Glutathione Assay	グルタチオン（発光）	酸化ストレス条件下におけるグルタチオンレベルの変化にともなう細胞生存性の変化を観察（16 ページ）。
HDAC-Glo™ I/II Assay	ヒストン脱アセチル化酵素（発光）	脱アセチル化酵素活性の変化にともなう細胞生存性の変化を観察（18 ページ）。
P450-Glo™ CYP3A4 Assay with Luciferin-IPA & ONE-Glo™ Luciferase Assay	CYP3A4（発光）、レポーターアッセイ（発光）	CYP3A4 酵素活性、CYP3A4 転写活性を生細胞数で補正（17, 23 ページ）。

製品名 サイズ カタログ番号 価格（¥）

CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay

アッセイシステム

CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay	10ml	G6080	16,000
	5 × 10ml	G6081	65,000
	2 × 50ml	G6082	100,000

- ・ 10ml は 96 ウェルプレートで 100 ウェル分。
- ・ バルク注文については弊社までお問い合わせください。

プロメガ資料：www.promega.co.jp/lit/celltiterfluor.html

細胞生存性

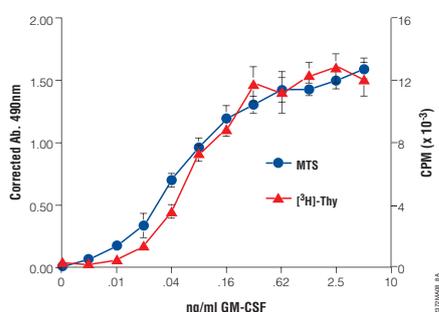
NADH

発色

CellTiter 96® AQueous One Solution
Cell Proliferation Assay

実績のあるMTS法

細胞増殖や細胞毒性試験における生細胞数を測定する比色定量分析用試薬です。試薬には新しいテトラゾリウム化合物 (MTS) と電子捕獲剤 PES が含まれます。MTSとの共存下でPESがより安定化するため、便利な単一溶液にすることができました。他のMTTやINTのようなテトラゾリウム化合物と比較し、MTSホルマゼン産物は可溶性が不要なため簡便です。試薬添加後に1~4時間のインキュベーションを行います。MTS (Owen's Reagent) が生細胞によって還元され、培地に可溶性有色のホルマゼン産物に変換されます (有機溶媒で溶解する必要がありません)。96ウェルプレートリーダーを用いて490nmで測定すれば、容易に測定できます。490nmのホルマゼン定量値が、培地中の生細胞数に比例します。本製品は ^3H -thymidine取り込み法の代わりに使用することができます。



GM-CSFにより刺激されたHT-2細胞の増殖試験における ^3H thymidine取り込み試験との比較

製品名 サイズ カタログ番号 価格 (¥)

CellTiter 96 AQueous One Assay

アッセイシステム

CellTiter 96® AQueous One Solution	1,000 回分	G3580	23,000
Cell Proliferation Assay	5,000 回分	G3581	77,000
	200 回分	G3582	6,000

- ・表示のサイズは96ウェルプレートの場合
- ・バルク注文については弊社までお問い合わせください。

プロメガ資料: www.promega.co.jp/lit/celltitaqone.html

細胞生存性

NADH

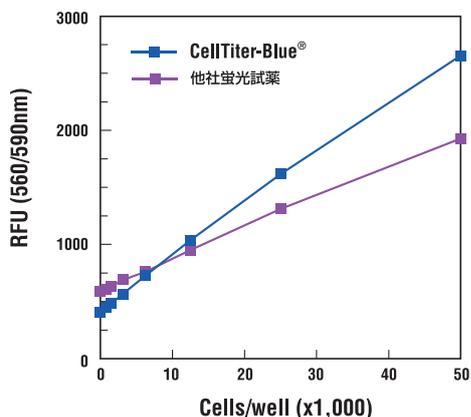
蛍光

CellTiter-Blue® Cell Viability Assay
コストパフォーマンスに優れた蛍光細胞増殖試験

励起波長: 560nm

蛍光波長: 590nm

細胞の生存性を蛍光でモニタリングするための細胞増殖試験試薬です。酸化還元色素であるレサズリンが生細胞により蛍光産物レゾルフィンに変換されることに基づいています。生存性が失われた細胞は、急激に代謝活性が低下するために、蛍光シグナルを生じません。また、このホモジニアスアッセイフォーマットにより血清を含む培地で培養した細胞に1種類の試薬を直接添加するだけで測定が行えます。インキュベーション後、フルオロメーターおよびスペクトロフォトメーターの両方で測定することができます。



CellTiter-Blue と他社製品との感度の比較

製品名 サイズ カタログ番号 価格 (¥)

CellTiter-Blue Assay

アッセイシステム

CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	20ml	G8080	17,000
	100ml	G8081	48,000
	10X100ml	G8082	415,000

- ・20ml は96ウェルプレートで1000ウェル分、384ウェルプレートで400ウェル分。
- ・バルク注文については弊社までお問い合わせください。

プロメガ資料: www.promega.co.jp/lit/celltitblue.html

細胞毒性

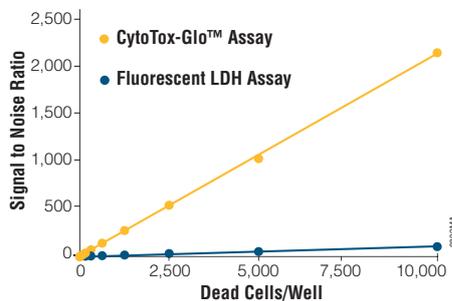
DCP

発光

CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay

プロテアーゼマーカーによる新しい細胞毒性試験

CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assayは、細胞集団中の死細胞数を測定するための発光アッセイシステムで、死細胞由来プロテアーゼ活性を細胞毒性のマーカーとして使用します。発光性細胞非透過性ペプチド基質（AAF-aminoluciferin）は、細胞膜の完全性を失った細胞から放出される死細胞由来プロテアーゼ活性を測定するために使用します。遊離したアミノルシフェリンは、アッセイ試薬に含まれるUltra-Glo™ Recombinant Luciferaseにより生じる グロータイプの発光として測定されます。AAF-aminoluciferin substratは、生細胞のインタクトな細胞膜は透過できないため、生細胞集団からシグナルは生じません（検出限界以下）。本製品に添付される細胞溶解剤を加えることにより、各アッセイウェル内の総細胞数に応じた発光シグナルを得ることもできます。そのため、この総細胞数の発光値から死細胞の発光シグナルを差し引くことにより生存性を算出することもできます。CytoTox-Glo™ Assayは、細胞生存性を測定する他の方法と非常に良く相関します。



LDH 蛍光アッセイ法に比べ優れた CytoTox-Glo™ Assay の感度、ダイナミックレンジ

製品名 サイズ カタログ番号 価格 (¥)

CytoTox-Glo™ Assay

アッセイシステム

CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay	10ml	G9290	18,000
	5X10ml	G9291	71,000
	2X50ml	G9292	110,000

・ 10ml は 96 ウェルプレートで 100 ウェル分、384 ウェルプレートで 400 ウェル分。

・ バルク注文については弊社までお問い合わせください。

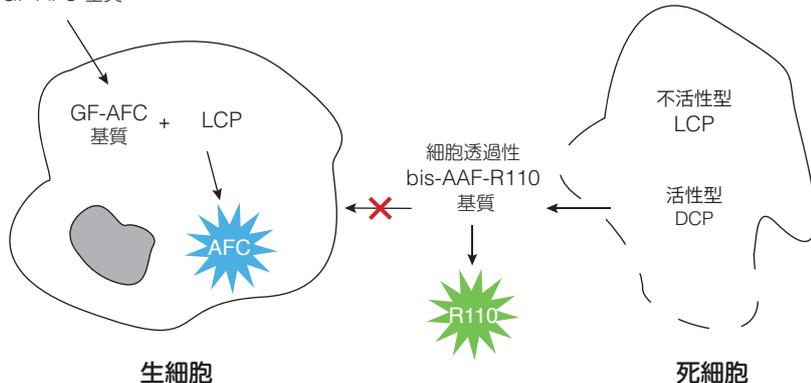
プロメガ資料： www.promega.co.jp/lit/cytotoxglo.html

新しい細胞生存性・毒性試験のためのバイオマーカー (LCP, DCP)

培養細胞の生存性や毒性を測定するバイオマーカーはこれまでもいくつも利用されていますが、いずれも技術的な問題点を抱えているのが現状です。プロメガでは恒常的な機能を有するプロテアーゼに絞ってペプチドベースのプロテアーゼ活性スクリーニングを行い、細胞生存性と細胞毒性に関連する2つの新しいバイオマーカーを発見しました。

生細胞プロテアーゼ (LCP: Live Cell Protease) は細胞透過性の蛍光前駆ペプチド基質 Gly-Phe-7-amino-4 trifluoromethyl coumarin (GF-AFC) を用いて測定します。この生細胞プロテアーゼマーカーは、細胞膜の完全性が失われて周囲の培地に漏出すると不活性化され、生細胞で起こるような反応は見られなくなります。一方、死細胞プロテアーゼ (DCP: Dead Cell Protease) マーカーは細胞膜の完全性が失われた細胞から漏出して初めて測定されます。この活性は細胞非透過性の蛍光前駆ペプチド基質 bis-(Ala-Ala-Phe)-rhodamine110 (bis-AAF-R110) で測定します。発光ではこの死細胞由来プロテアーゼ活性を細胞非透過性の発光基質 Ala-Ala-Phe-アミノルシフェリン (AAF-Glo™ 基質) を用いて測定することができます。

細胞透過性
GF-AFC 基質



新しい細胞生存性・毒性試験の測定原理

GF-AFC 基質は生細胞に透過し、“生細胞”プロテアーゼ (LCP) による切断で AFC を遊離する。bis-AAF-R110 基質は生細胞に透過できず、漏出した“細胞死”由来のプロテアーゼ (DCP) により R110 を遊離する。

細胞毒性

LDH

蛍光

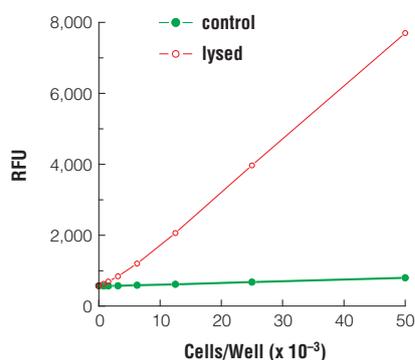
CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay

LDHを蛍光測定する簡便な細胞毒性試験

励起波長：560nm

蛍光波長：590nm

本製品は、マルチウェルプレートで非生存性細胞の数を推定する蛍光法によるホモジニアスタイプのアッセイシステムです。細胞膜にダメージを受けた細胞から漏出した乳酸脱水素酵素（LDH）を、レサズリン/ジアホラーゼ共役系を介して生成するレゾルフィンの蛍光として定量することができます。用事調製した CytoTox-ONE™ Reagent を細胞/培地を含む各ウェルに添加し、10分間インキュベートを行った後、StopSolutionを加え、蛍光を測定（励起波長560nm、蛍光波長590nm）します。CytoTox-ONE™ Reagent は、健康な細胞にダメージを与えないため、生存細胞とダメージを受けた細胞が混在する培養ウェルで直接LDHを測定できるようにデザインされています。



細胞数と蛍光強度における直線性

96 ウェルプレートに 2 倍希釈系列で L929 細胞を添加し、Triton® X-100 で処理したものを "Lysed"、PBS を添加したものを "Control" とした。

製品名 サイズ カタログ番号 価格 (¥)

CytoTox-ONE™ Assay

アッセイシステム

CytoTox-ONE® Homogeneous Membrane Integrity Assay	200 回分	G7890	17,000
	1,000 回分	G7891	52,000

- ・表示の回数は 96 ウェルフォーマットの場合。
- ・バルク注文については弊社までお問い合わせください。

プロメガ資料：www.promega.co.jp/lit/cytotoxone.html

細胞毒性

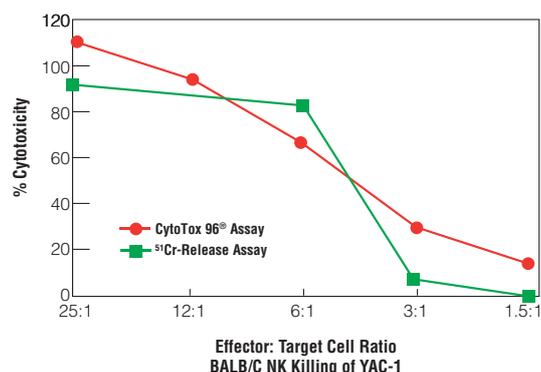
LDH

発色

CytoTox-96® Cytotoxicity Assay

発色法による漏出LDH測定

細胞の障害により漏出した乳酸脱水素酵素（LDH）を発色法により定量するシステムで、従来の⁵¹Cr放出試験をNon-RIで行うことができます。細胞上清に放出されたLDHと30分間の酵素反応を行い、テトラゾリウム塩（INT）から変換された赤色フォルマザンを490nmで測定します。生成した赤色ホルマザン量と溶解細胞数とが直線的に比例します。このアッセイは、エフェクター細胞によるターゲット細胞の溶解や、細菌・ウィルス・タンパク質・化学物質などによる細胞溶解など、細胞膜の完全性を測定する場合に使用します。

細胞毒性試験における CytoTox 96 と ⁵¹Cr 放出アッセイの相関性

製品名 サイズ カタログ番号 価格 (¥)

CytoTox-96 Assay

アッセイシステム

CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	1,000 回分	G1780	37,000
--	----------	-------	--------

- ・表示のサイズは 96 ウェルプレートの場合。

プロメガ資料：www.promega.co.jp/lit/cytotox.html

アポトーシス&細胞生存性・毒性

カスパーゼ・LCP・DCP

蛍光・発光

ApoTox-Glo™ Assay

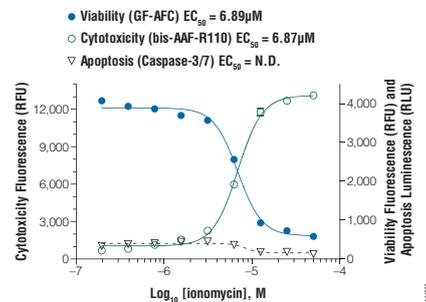
細胞死のメカニズムを1サンプルより判定



	AFC	R110
励起波長:	400nm	485nm
蛍光波長:	505nm	520nm

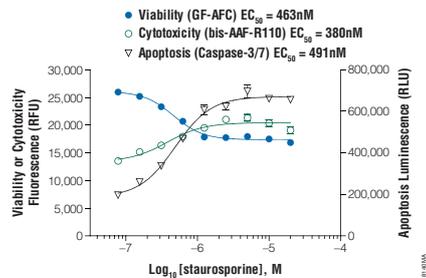
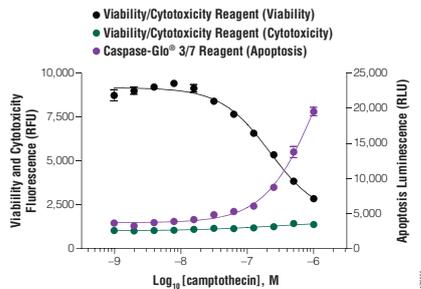
ApoTox-Glo™ Triplex Assay は、培養細胞を含む単一のウェルから細胞生存性/毒性/アポトーシスの各イベントについて容易に評価するための3つのアッセイケミストリを組合せたシステムです。まず、2種類のペプチド基質を含む細胞非溶解性の試薬を加え、2つの異なるプロテアーゼバイオマーカーを同時に測定して生存性および毒性を決定します。生細胞プロテアーゼ活性はインタクトな生存細胞に限定され、細胞透過性の蛍光ペプチド基質 (GF-AFC Substrate) で測定されます。この基質がインタクトな細胞に入ると、切断されて生細胞数に比例した蛍光シグナルを生じます。この生細胞活性マーカーは細胞膜が障害され培地に漏出すると不活性化されます。同時に、細胞非透過性の蛍光ペプチド基質 (bis-AAF-R110 Substrate) は細胞膜の完全性が失われて外部に漏出した死細胞プロテアーゼ活性の測定に使用されます。この結果、レシオメトリック測定 (比率測定) として細胞生存性と細胞毒性の値が逆相関することになります。生細胞と死細胞の比率は、細胞数とは独立した数値となり補正されたデータとして取り扱うことができます。2つめの試薬としてカスパーゼ3/7測定のためのDEVD-ペプチドが付加された発光基質と耐熱性組換えルシフェラーゼUltra-Glo™を添加します。カスパーゼ3/7により基質が切断されてルシフェリンが遊離し、これがルシフェラーゼの基質となり発光を生じます。生じた光はルミノメーターで測定され、アポトーシスの主要なマーカーであるカスパーゼ3/7活性と相関します。

- 1 ウェルより細胞生存性/毒性/アポトーシスを測定: 1つのサンプルから細胞死のメカニズムを決定。
- 簡便: シンプルな " 添加 - 混和 - 測定 " だけのプロトコル。
- ビルトインコントロールによる補正されたデータ: 生細胞数と死細胞数の比率は細胞数と独立した補正データで、ウェル間、プレート間、実験日間での比較が容易。
- 柔軟で容易に自動化: 添加する各アッセイ試薬の容量はスケールを自由に変わらされるため多検体処理にマッチし、96 や 384 プレートでの自動化も容易。
- 効率化とコスト削減: 1 ウェルで 3 つのアッセイを行えるため細胞培養コストや人件費を削減可能。



ネクローシスの典型的なデータ

Jurkat細胞のイオノマイシン処理6時間後の結果。用量依存的に細胞生存性が低下、細胞毒性が増加、カスパーゼ3/7の活性化は認められず、初期ネクローシスと一致。



サイトスタシス (細胞増殖抑制) の典型的なデータ

Jurkat細胞のカンプトテシン処理48時間後の結果。用量依存的に細胞生存性が低下、細胞毒性は認められず、カスパーゼ3/7活性が増加し、細胞周期の停止および初期アポトーシスと一致。

アポトーシスの典型的なデータ

Jurkat細胞のスタウロスポリン処理6時間後の結果。用量依存的に細胞生存性が低下、細胞毒性が増加、カスパーゼ3/7活性も増加し、アポトーシスと一致。

製品名 サイズ カタログ番号 価格 (¥)

ApoTox-Glo™ Triplex Assay

細胞生存性 + 細胞毒性 + アポトーシスアッセイシステム

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
ApoTox-Glo™ Triplex Assay	10ml	G6320	80,000
	5 × 10ml	G6321	245,000

- ・ 10ml は 96 ウェル形式で 100 ウェル分。
- ・ バルク注文については別途お問合わせください。

プロメガ資料: www.promega.co.jp/lit/apotox.html

製品名 サイズ カタログ番号 価格 (¥)

その他のマルチアッセイ試薬

アッセイシステム

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay	10ml	G9270	31,000
(細胞生存性 [蛍光] + 細胞毒性 [発光])	5 × 10ml	G9271	89,000
MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay	10ml	G9200	29,000
(細胞生存性 [蛍光] + 細胞毒性 [蛍光])	5 × 10ml	G9201	81,000
ApoLive-Glo™ Multiplex Assay NEW	10ml	G6410	75,000
(細胞生存性 [蛍光] + アポトーシス [発光])	5 × 10ml	G6411	224,000

- ・ 10ml は 96 ウェル形式で 100 ウェル分。
- ・ バルク注文については別途お問合わせください。

プロメガ資料: www.promega.co.jp/lit/multitox.html
www.promega.co.jp/lit/apolive.html

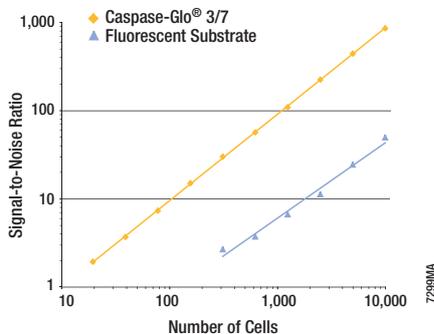
Caspase-Glo® Assay

高感度でシンプルなカスパーゼアッセイシステム

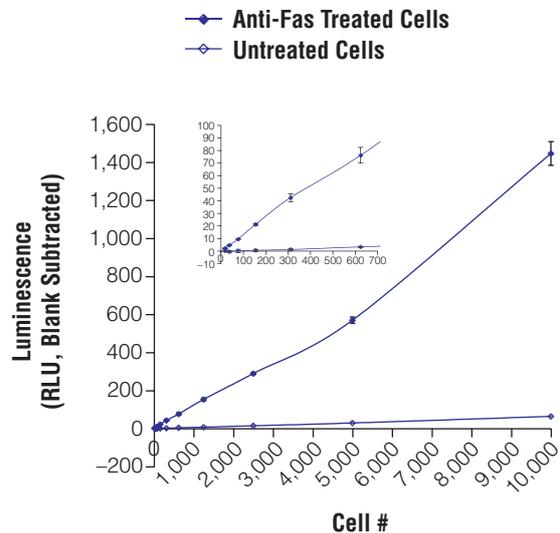
Caspase-Glo® Assaysは、各種カスパーゼ活性を測定するためのホモジニアスフォーマット発光アッセイシステムです。本アッセイでは、プロテアーゼ認識配列を付加した発光基質アミノルシフェリンと特殊な耐熱性ルシフェラーゼを含む試薬がベースになっており、カスパーゼ活性に最適化されています。Caspase-Glo® Reagent を添加すると細胞が溶解し、続いてカスパーゼにより基質が切断されます。遊離したアミノルシフェリンは耐熱性のUltra-Glo™ Recombinant Luciferaseにより消費され、“グロータイプ”の発光シグナルを生じます。このシグナルはカスパーゼ活性に比例します。安定化されたルシフェラーゼおよび特殊なバッファシステムは、広範なアッセイ条件でのパフォーマンスを向上させます。本アッセイは、蛍光法や発色法のアッセイに比べて化合物による影響を受け難くなっています。

Caspase-Glo® 3/7, 8および9 Assaysは培養細胞あるいは精製酵素を用いたマルチウェルプレートでのアッセイ用にデザインされています。Caspase-Glo® 2および6 Assaysは、精製酵素を用いたアッセイ用に開発されています。Caspase-Glo® 8および9 Assaysには、非特異的なバックグラウンドをより低減するプロテアーゼ阻害剤MG-132が新たに添付されています。

- ・ **30分で完了**：最も簡便なアポトーシスの判定法（サンプルと等量の試薬を1種類加えるのみ）。
- ・ **高感度**：感度に優れる発光法（20個の細胞でも検出）。
- ・ **優れたS/N**：蛍光法に比べ、低いバックグラウンド。
- ・ **優れたパフォーマンス**：細胞ベース、酵素ベースのアッセイとも優れたZ'-factor値を提示。
- ・ **長時間発光**：3時間安定なシグナルを生じるためバッチ法によるプレート処理も可能。
- ・ **マルチアッセイ**：他のセルベースアッセイとの併用が可能。



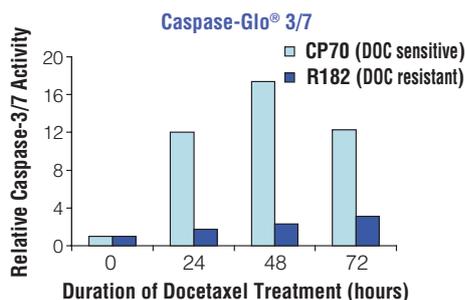
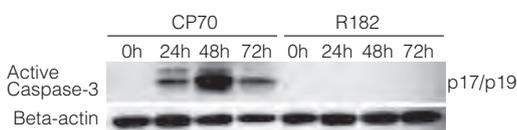
蛍光法と Caspase-Glo の感度とダイナミックレンジの比較



Jurkat 細胞を用いた場合の Caspase-Glo 3/7 Assay の感度

Jurkat 細胞は抗-Fas mAb で 4.5 時間処理し、アポトーシスを誘導した。Caspase-Glo® Reagent 添加 1 時間後に測定した。

Western Analysis



ウェスタン分析と Caspase-Glo の相関性

製品名 サイズ カタログ番号 価格 (¥)

Caspase-Glo Assay

細胞・酵素ベースアッセイシステム

Caspase-Glo® 3/7 Assay	2.5ml	G8090	19,000
	10ml	G8091	70,000
	100ml	G8092	340,000
Caspase-Glo® 8 Assay	2.5ml	G8200	19,000
	10ml	G8201	70,000
Caspase-Glo® 9 Assay	2.5ml	G8210	19,000
	10ml	G8211	70,000

・ 10ml は 96 ウェル形式で 100 ウェル分。

その他のカスパーゼアッセイ

酵素ベースアッセイシステム

Caspase-Glo® 2 Assay	10ml	G0940	70,000
Caspase-Glo® 6 Assay	10ml	G0970	70,000

・ 10ml は 96 ウェル形式で 100 ウェル分。

プロメガ資料： www.promega.co.jp/lit/casp glo.html

アポトーシス

カスパーゼ

蛍光

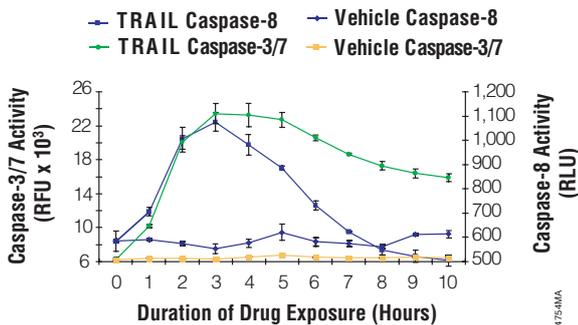
Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay

簡便な蛍光によるカスパーゼ3/7アッセイシステム

励起波長：499nm

蛍光波長：521nm

本製品はカスパーゼ3および7の活性を迅速で感度よく検出するホモジニアスフォーマットの試薬です。この試薬には蛍光前駆基質 Z-DEVD-rhodamine 110および哺乳動物細胞を効率よく溶解する働きとカスパーゼ3/7の活性を最適化する2つの機能を持つバッファーから構成されます。基質をバッファーで溶解後、直接サンプルに加え、軽く混和し、必要な時間インキュベーションを行い蛍光プレートリーダーで測定します。カスパーゼ3/7活性によりDEVDペプチド基質のアスパラギン酸残基のC末端側が連続して切断され、クエンチングペプチドが除去されると遊離したrhodamine 110が蛍光を発します。発光法のCaspase-Glo® 8あるいは9とのマルチアッセイを行うことができます。カスパーゼ3/7定量には精製された酵素や細胞抽出液、培養細胞（付着細胞・浮遊細胞・初代培養細胞）をサンプルとして使用します。この定量試薬はフレキシブルでハイスループットシステムにも対応します。



製品名 サイズ カタログ番号 価格 (¥)

Apo-ONE Assay

アッセイシステム

Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay	1ml	G7792	6,000
	10ml	G7790	62,000
	100ml	G7791	298,000

Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Buffer

100ml G7781 202,000

・ 10ml は 96 ウェルプレートで 100 ウェル分、384 ウェルプレートで

400 ウェル分。

・ バルク注文については別途お問い合わせください。

プロメガ資料：www.promega.co.jp/lit/apoone.html

発光カスパーゼ-8アッセイと蛍光カスパーゼ3/7アッセイのマルチアッセイ

Jurkat 細胞を 25,000 個 / ウェルで播種した。rTRAIL または ビークルコントロールをタイムポイントごとの複製ウェルに 1 時間づつずらして 10 時間にわたって添加した。蛍光カスパーゼ 3/7 基質 [(Z-DEVD) 2-R110] は Caspase-Glo™ Reagent に混和した。調製した各試薬 100µl を添加した後、60 分間インキュベーションし、発光および蛍光を測定した。

アポトーシス

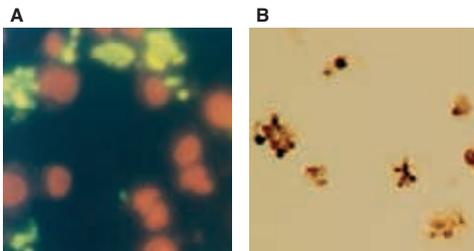
DNA 断片化

蛍光・発色

DeadEnd™ TUNEL Systems

DNA断片化を蛍光あるいは発色により観察

DeadEnd™ TUNEL Systemは、アポトーシス細胞を細胞単位で高感度に検出・定量するための試薬が含まれます。TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling) を用いて、アポトーシス細胞で観察されるDNAフラグメントの3'-OH末端にfluorescein-12-dUTP (蛍光) またはビオチン化ヌクレオチド (発色) を結合します。どちらのシステムにもPlastic Coverslipが添付されます。



パネル A: カンプトテシンで処理した HL-60 細胞を Fluorometric System で検出した。パネル B: アニソマイシンで処理した HL-60 細胞を Colorimetric System で検出した。

製品名 サイズ カタログ番号 価格 (¥)

DeadEnd™ TUNEL System

検出システム

DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System	60 回分	G3250	62,000
DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System	20 回分	G7360	40,000
	40 回分	G7130	62,000

プロメガ資料：

Fluorometric System: www.promega.co.jp/lit/deadendfluor.html

Colorimetric System: www.promega.co.jp/lit/deadendcolor.html

アポトーシス

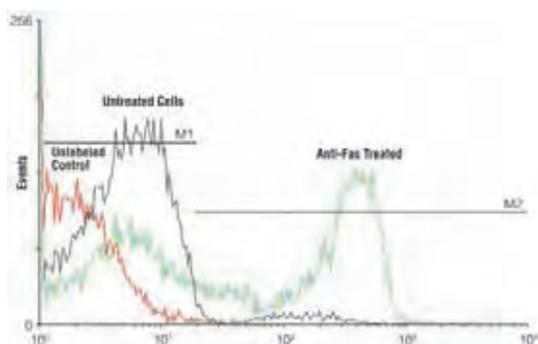
カスパーゼ

蛍光

CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker

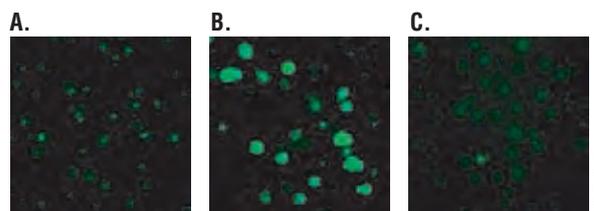
フローサイトメトリーに最適なカスパーゼマーカー

細胞透過性のフルオロチオシアネート (FITC) 標識カスパーゼ阻害剤VAD-FMKです。この構造は細胞への移動を容易にし、透過した阻害剤は活性化カスパーゼに不可逆的に結合します。FITC標識により細胞内におけるカスパーゼ活性の定量を直接的にワンステップで行うことができます。本製品は蛍光検出によりカスパーゼ活性をin situでモニタリングすることができます。



CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker で標識したアポトーシス Jurkat 細胞のフローサイトメトリー分析

ヒト Jurkat 細胞を 100ng/ml anti-Fas 抗体で 4 時間処理したものと未処理のものを 10μM CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker でインキュベートした。蛍光値は log スケールでプロットした。M1 はバックグラウンド細胞を、M2 は標識された細胞を示す。Anti-Fas 処理と未処理の細胞は若干のオーバーラップを示すが、優れたシグナル/ノイズ比を示した。



CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker によるアポトーシスを起こしている Jurkat 細胞の標識

パネル A : 未処理の Jurkat 細胞、パネル B : anti-Fas mAb 処理後の Jurkat 細胞、パネル C : アポトーシスを阻害するために FITC-VAD-FMK で前処理した後、anti-Fas mAb を加えた Jurkat 細胞。全てのサンプルはスライド上に調製し、CaspACE™ FITC-VAD-FMK で染色した。

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
CaspACE™ In Situ Marker			
検出システム			
CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker	50μl	G7461	35,000
	125μl	G7462	75,000

プロメガ資料 : www.promega.co.jp/lit/caspismark.html

アポトーシス

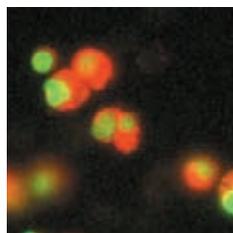
イメージング

ウエスタン

Antibodies

様々なアポトーシスマーカーを検出

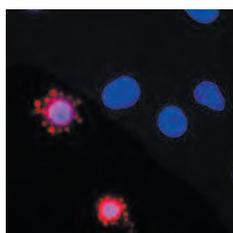
活性化型カスパーゼ-3や分解型PARPなどのマーカーを検出することにより、様々な角度からアポトーシスを確認することができます。



Anti-PARP p85 Fragment pAb

本抗体はヒト poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) [116kDa] がカスパーゼにより分解された産物 85kDa 断片 (p85) を特異的に認識するポリクローナル抗体です。PARP 分解産物に特異的であるため、アポトーシスの初期段階を検出するための新しい in situ マーカーとして使用できます。この抗体は細胞/組織におけるアポトーシスマーカーとして免疫細胞染色/免疫組織染色で使用するためにデザインされており、免疫染色による品質管理テストを行っています。より多様なアポトーシスのステージを分析するために、TUNEL 法と組合せた 2 重標識法にも使用することができます。50 反応 (100 倍希釈) に充分な量の抗体が供給されます。

細胞染色 組織染色 ウエスタン



Anti-ACTIVE Caspase-3 pAb

Anti-ACTIVE® Caspase-3 pAbはヒト-カスパーゼ-3のp17断片ペプチドで作成されたウサギポリクローナル抗体です。アポトーシス細胞に存在する活性化型カスパーゼ-3を特異的に認識するもので、in situ で簡単にアポトーシスを検出することができます。この抗体はヒト、マウス、ラット、ハムスターのアミノ酸配列と同じ抗原性ペプチドを用いて作成されているため、広範な動物種で交差反応性を示すことが期待されます。

細胞染色 組織染色

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
Apoptosis Antibodies			
抗体			
Anti-ACTIVE® Caspase-3 pAb	50μl	G7481	42,000
Anti-PARP p85 Fragment pAb	50μl	G7341	62,000

プロテアソーム活性

プロテアソーム

発光

Proteasome-Glo™ Cell Based Assay

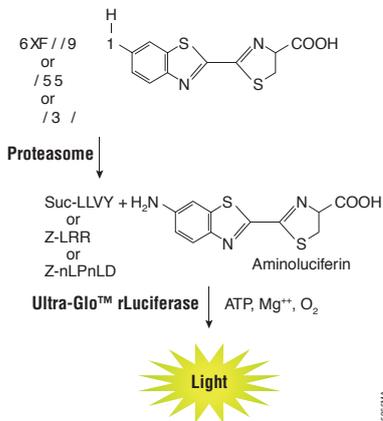
細胞内のプロテアソーム活性を高感度に測定



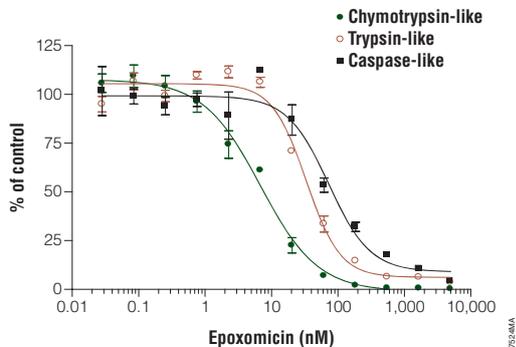
Proteasome-Glo™ Cell Based Assay は、培養細胞内に存在するプロテアソーム複合体のキモトリプシン様、トリプシン様、カスパーゼ様プロテアーゼ活性を測定するための発光ホモジニアスアッセイシステムです。26Sプロテアソームは全ての真核細胞内に認められる2.5MDaの複数のタンパク質で構成される複合体です。Proteasome-Glo™ Cell Based Assayでは、特殊なバッファー（細胞透過性、プロテアソーム活性およびルシフェラーゼ活性に最適化）に溶解したプロテアソームに対する発光基質を使用します。“添加-混和-測定”の簡単なフォーマットで、Proteasome-Glo™ Cell Based Assay Reagentが添加されるとプロテアソームによる基質の切断が起こり、さらにルシフェラーゼ反応により迅速に発光シグナルが生じます。

本システムでは各プロテアーゼの活性に特異的な発光基質、Suc-LLVY-aminoluciferin（キモトリプシン様活性）、Z-LRR-aminoluciferin（トリプシン様活性）、Z-nLPnLD-aminoluciferin（カスパーゼ様活性）を用います（※ Suc-LLVY, Z-LRR またはZ-nLPnLDの配列を含む発光基質は20Sプロテアソームにも認識されます）。

- ・生体内に近い結果：細胞内環境から直接プロテアソーム活性データを取得。
- ・簡単な操作：“添加-混和-測定”だけのプロトコルなので手間が少なく、自動化も容易。
- ・迅速：最大の感度は試薬添加後約10～30分で得られます。
- ・優れた感度：発光法は蛍光法特有の蛍光バックグラウンドがないため優れたシグナル/バックグラウンド比が得られます。384フォーマットへのミニチュア化も容易です。

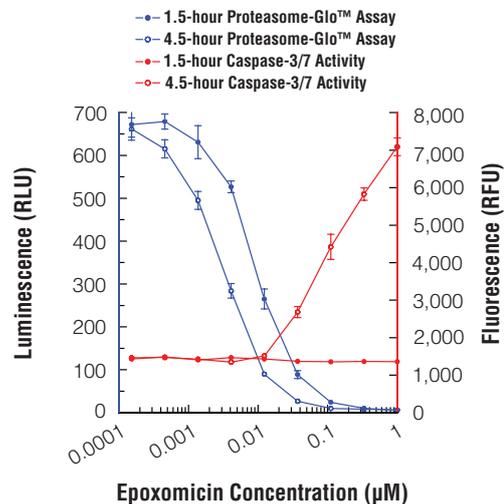


Proteasome-Glo™ の測定原理



384 ウェルプレートフォーマットでのプロテアソーム活性のエポキシマイシンによる阻害

U266 細胞 (5,000 個 / ウェル) を 384 ウェルプレートに播種した。エポキシマイシンの段階希釈液を培地を用いて調製し、5 μ l を各ウェルに添加した。22 $^{\circ}$ C、2 時間インキュベートし、Proteasome-Glo™ Cell-Based Reagent を 25 μ l / ウェル添加し、測定した。



プロテアソームおよびカスパーゼ 3/7 活性検出のための連続マルチアッセイ

H929 細胞 (10,000 個 / ウェル) を 96 ウェルプレートに播種した。1 昼夜培養した後、エポキシマイシン (10 μ l / ウェル) とともに 1.5 または 4.5 時間インキュベートした。Proteasome-Glo™ Cell Based Assay Reagent 添加 15 分後に発光を測定した。その後すぐに Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Reagent を 20 μ l / ウェル添加した。アッセイプレートを 22 $^{\circ}$ C、30 分間混和してカスパーゼ 3/7 による蛍光を検出した。

製品名 サイズ カタログ番号 価格 (¥)

Proteasome-Glo™ Assay

アッセイシステム

Proteasome-Glo™ Chymotrypsin-Like Cell-Based Assay	10ml	G8660	94,000
	5 × 10ml	G8661	293,000
	2 × 50ml	G8662	480,000
Proteasome-Glo™ Trypsin-Like Cell-Based Assay	10ml	G8760	94,000
	5 × 10ml	G8761	293,000
Proteasome-Glo™ Caspase-Like Cell-Based Assay	10ml	G8860	94,000
	5 × 10ml	G8861	293,000
Proteasome-Glo™ 3-Substrate Cell-Based Assay System	各 10ml	G1180	231,000
	各 5 × 10ml	G1200	738,000

・10ml は 96 ウェルプレートで 100 ウェル分、384 ウェルプレートで 400 ウェル分。

・Proteasome-Glo™ 3-Substrate Cell-Based System は 3 種のプロテアソーム測定試薬のセットです。

・バルク注文については別途お問い合わせください。

プロメガ資料：www.promega.co.jp/lit/proteasomeglo.html

酸化ストレス

グルタチオン

発光

GSH/GSSG-Glo™ Assay

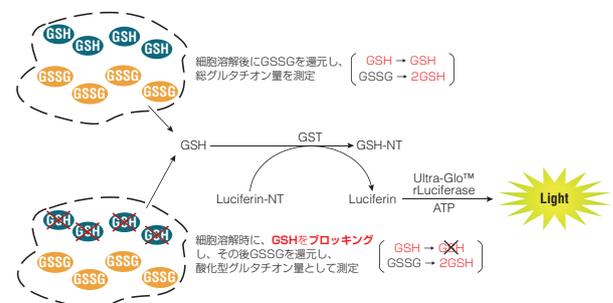
除タンパク操作の不要な高感度グルタチオンアッセイ



GSH/GSSG-Glo™ Assay は、培養細胞内の総グルタチオン (GSH + GSSG)、GSSG、GSH/GSSG比を検出、定量するための発光アッセイシステムです。アッセイはシンプル、迅速なマルチウェルプレートフォーマットを提供し、生じる安定した発光シグナルは培養ウェル内サンプルの総GSHあるいはGSSG濃度に相関します。総グルタチオンおよびGSSGの決定は、GSH依存的にLuciferin-NT (GSHプローブ) がグルタチオン-S-トランスフェラーゼによりルシフェリンへ変換される反応とホタルルシフェラーゼ反応のカップリングに基づいています。ルシフェラーゼからの発光は、GSH存在量に依存して生成したルシフェリン量に比例します。総グルタチオンとGSSGの決定は並行して実施することができます。1つは還元剤を用いて細胞ライセートに含まれるすべてのグルタチオン (GSHおよびGSSG) を還元型のGSHに変換して測定する方法です。もう1つは酸化型のGSSGだけを測定する方法です。この方法ではライセートに含まれるインタクトなGSSGをGSHと分けるために全てのGSHをブロックする試薬を加えます。このブロッキング工程の後にGSSGをGSHに変換して発光反応で定量します。培養ウェル内の細胞で直接定量できるためGSHやGSSGのロスが最小限に抑えられバラツキが低減します。

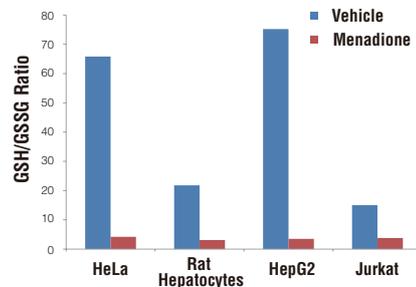
- ・ **生体に近い GSH/GSSG 比**：総グルタチオンや GSSG の実質レベルを細胞培養ウェルで直接測定できるので、従来法に比べて GSH や GSSG のロスを抑えサンプルの調製作業や間接的な GSSG 算出も必要ありません。
- ・ **頑健なパフォーマンス**：生物発光技術およびシンプルなプロトコルにより、サンプルのハンドリングやバラツキが低減。
- ・ **シンプルなプロトコル**：マルチウェルプレート内の細胞に直接試薬を添加するホモジニアスな”添加 - 混和 - 測定”形式で、従来法のような時間のかかる除タンパクや遠心操作が不要。
- ・ **高い感度**：感度が高いので従来法よりも少数の細胞でアッセイが可能
- ・ **自動化が容易**：グロータイプの長時間発光(半減期2時間以上)なので 96 あるいは 384 ウェルプレートでの自動化が可能
- ・ **蛍光による干渉がありません**：発光ベースなので、蛍光アッセイにみられる試薬と化合物との蛍光干渉がありません。

総グルタチオン量測定 (GSH + GSSG)



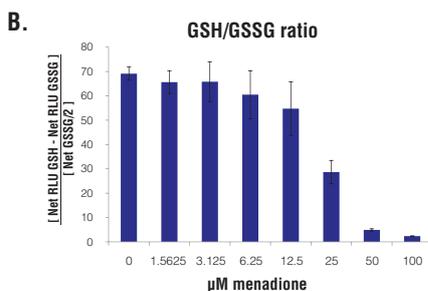
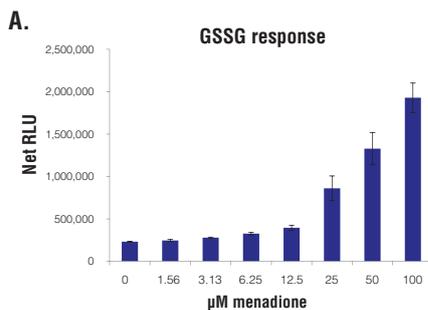
酸化型グルタチオン量測定 (GSSG)

GSH/GSSG-Glo™ の測定原理



各種細胞における GSH/GSSG 比の測定

各細胞は 40μM メナジオン (Menadione) または 0.1% DMSO (Vehicle) で 37° C、60 分間処理した。いずれの細胞でもメナジオン処理により GSSG が増加し、GSH/GSSG 比が低下することが示された。



メナジオン濃度にもなう GSSG レベルの増加

肺腺癌細胞 A549 (5,000 個 / ウェル) を表示濃度のメナジオンで 60 分間処理した。メナジオン濃度に依存して GSSG が増加し、GSH/GSSG 比が低下した。発光値から簡単に比率を算出できる。

製品名 サイズ カタログ番号 価格 (¥)

GSH/GSSG-Glo™ Assay

アッセイシステム

GSH/GSSG-Glo™ Assay	10ml	V6611	84,000
	50ml	V6612	337,000

・表示のサイズは 96 ウェルプレートフォーマットで 100 反応分 (総グルタチオンまたは GSSG 100 反応分、GSH/GSSG 比の決定なら 50 反応分)

プロメガ資料: www.promega.co.jp/lit/gshgssglo.html

その他の GSH アッセイ

GSH-Glo™ Assay	10ml	V6911	64,000
	50ml	V6912	264,500

・10ml は 96 ウェルプレートで 100 ウェル分、384 ウェルプレートで 400 ウェル分。

プロメガ資料: www.promega.co.jp/lit/gshglo.html

P450活性

P450

発光

P450-Glo™ Assay (Cell Based)

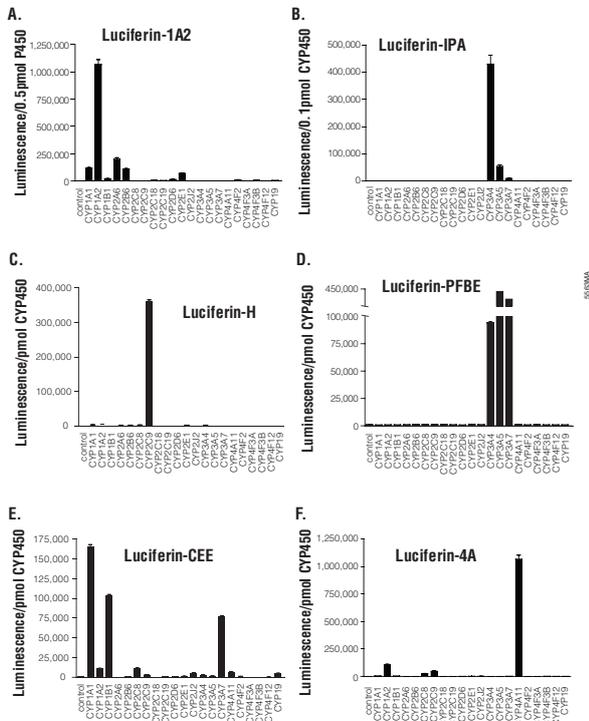
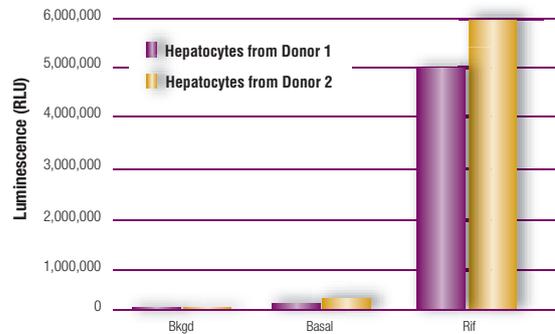
細胞内のP450活性を簡便に測定



P450-Glo™ (CellBased) Assayは発光法を利用してシトクロムP450活性を測定するためのシステムです。この発光法によるアッセイは、非常に優れた感度を有し、低いバックグラウンド、広いダイナミックレンジを示します。P450-Glo™ Assayでは、ルシフェリン誘導体であるP450発光基質を利用し、P450活性により変換されたルシフェリンをルシフェラーゼ発光量として検出することができます。P450-Glo™ Assayで生成する“グロータイプ”の発光シグナルは、耐熱性ルシフェラーゼと特殊なバッファシステムを組み合わせることにより実現しました。

P450発光基質および反応産物（ルシフェリン）は細胞透過性であるため細胞ベースのアッセイが可能です。発光性基質と培養細胞をインキュベートすると細胞内のCYP酵素により変換されたルシフェリンは、非溶解アッセイ（細胞上澄を移してアッセイ）あるいは溶解アッセイ（細胞を含むウェルでアッセイ）で測定されます。非溶解アッセイの場合、P450活性測定後に残る細胞を利用して他の細胞ベースアッセイを行うことができます（細胞生存性試験：CellTiter-Glo®など）。P450-Glo™ Assayを用いた細胞ベースのアプリケーションとして、基底CYP活性の測定、テスト化合物による活性誘導、テスト化合物による基底活性/誘導活性の阻害、核内受容体活性化の追跡（PXR, PXR, CAR, AHR, PPARα）などがあります。

- ・迅速：煩雑で時間のかかるLC/MSや薄層クロマトグラフィーに比べ飛躍的に分析時間を短縮化。
- ・シンプル：簡単なプロトコルなのでマルチウェルプレートを用いたハイスループットスクリーニングに対応。
- ・蛍光による干渉なし：発光法なので、蛍光法で問題となる分析対象やNADPH、CYP基質の励起波長/蛍光波長の干渉が問題になりません。
- ・低い偽陽性：新規な安定型ホタルルシフェラーゼ（Ultra-Glo™ Luciferase）、バッファー組成によりルシフェラーゼ阻害による偽陽性を低減。



細胞ベースアッセイに適した特異性の高いP450発光基質

21種類のヒト-P450アイソフォームについて各P450-Glo™ Substrateを用いて測定した。

新鮮なヒト肝臓細胞を用いた高感度な細胞ベースアッセイ

二人のドナーから得たヒト肝臓細胞を10μM リファンピシムまたはビークルとして0.1% DMSO (basal) で48時間処理した。アッセイバックグラウンドは細胞を含まない培地を用いて測定した。処理後、4μM Luciferin-IPAを含む培地で培地交換し、細胞はさらに60分間インキュベートした。異なる白色ルミノメータープレートで培地サンプルを等量の Luciferin Detection Reagent with esterase と混和し、GloMax™ luminometer で測定した。

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
P450-Glo™ Assay (Cell Based)			
アッセイシステム			
P450-Glo™ CYP1A2 Induction/Inhibition Assay	10ml	V8421	20,000
	50ml	V8422	59,000
P450-Glo™ CYP3A4 Assay with Luciferin-IPA	10ml	V9001	20,000
	50ml	V9002	59,000
P450-Glo™ CYP3A4 Assay (Luciferin-PFBE) Cell-Based/Biochemical Assay	10ml	V8901	20,000
	50ml	V8902	59,000
P450-Glo™ CYP1A1 Assay (Luciferin-CEE)	10ml	V8751	20,000
	50ml	V8752	59,000
P450-Glo™ CYP2C9 Assay (Luciferin-H)	10ml	V8791	20,000
	50ml	V8792	59,000
Luciferin-4A	3mg	P1621	35,000

・96ウェルプレートの場合10mlは200ウェル分、50mlは1000ウェル分に相当（1ウェルあたり50μl使用）。384ウェルプレートの場合10mlは400ウェル分、50mlは2000ウェル分に相当（1ウェルあたり25μl使用）。

・バルク注文については別途お問合せください。

プロメガ資料：www.promega.co.jp/lit/p450glo.html

ヒストン脱アセチラーゼ活性

HDAC

発光

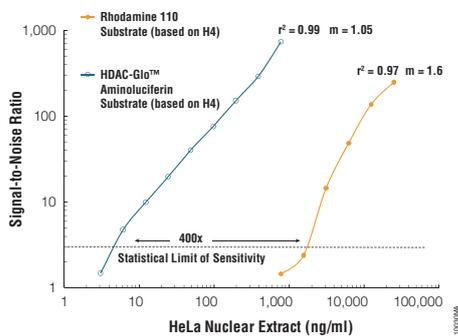
HDAC-Glo™ I/II Assay

細胞内のHDAC活性を高感度に測定



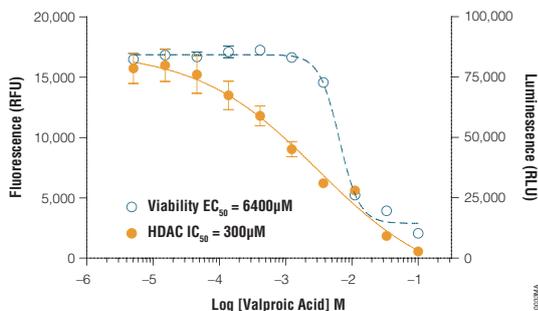
HDAC-Glo™ I/II Assay および Screening Systemは、1回の試薬添加だけで操作が完了するホモジニアスな発光アッセイシステムで、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）クラスIおよびIIの相対的な酵素活性を細胞、抽出液、精製酵素などのサンプルソースより測定することができます。このアッセイでは生細胞透過性の発光性アセチル化ペプチドアミノルシフェリン基質を使用し、これがHDAC活性により脱アセチル化されます。この脱アセチル化されたペプチドアミノルシフェリン基質はDeveloper Reagentに含まれるプロテアーゼによりペプチドが切除されます。この消化反応で生成したアミノルシフェリンがUltra-Glo™ 組換えホタルルシフェラーゼによる発光反応に利用されて発光シグナルを生じます。アッセイの反応は通常15~45分以内に完了し、サンプルを移換えるような手間もありません。HDACを介した発光シグナルは持続性（半減期3時間以上）を持ち、マルチウェルプレートのバッチ処理も行えます。このHDAC-Glo™ AssayはクラスIおよびIIの酵素で広く使用することができます。

- ・脱アセチル化活性の簡便な測定：試薬を1回加えるだけのホモジニアスな”添加-混和-測定”プロトコルなので実験台からスクリーニングへの移行が容易。
- ・高感度：同様の蛍光アッセイ法に比べ10~100倍の高い感度。
- ・迅速なデータ取得：最大のシグナルは15分程度で得られ、発光が長時間安定して持続するため、ハイスループットの自動化やインジェクターのないルミノメーターでの測定が可能
- ・柔軟なサンプルタイプ：生細胞、抽出液、精製された組換え酵素などで使用可能。
- ・マルチプレックスアッセイ：HDAC-Glo™ は同一ウェルで細胞生存性とのマルチアッセイが可能。



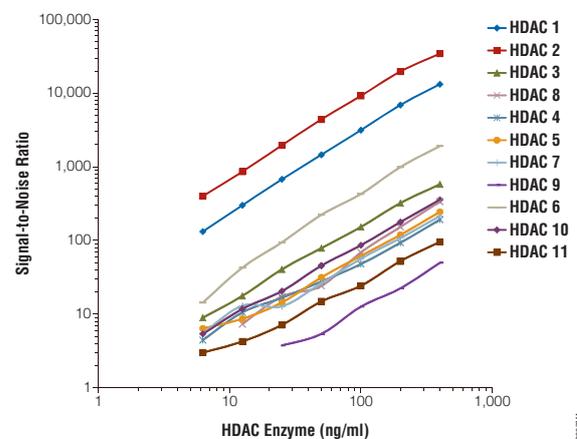
感度と直線性における発光法と蛍光法の比較

HDAC-Glo™ Assay は広範な濃度幅で優れた直線性を示し、蛍光法に比べ400倍以上のシグナル/ノイズ比が得られた。さらにHDAC-Glo™ では基質添加後20分後に結果が得られるのに対して蛍光法では2時間を要した。



HDAC活性と細胞生存性のマルチアッセイ

HDAC-Glo™ および CellTiter-Fluor™ Viability Assay（細胞生存性試験）を組み合わせ、癌細胞U937への阻害剤（バルプロ酸）の影響を調べた。得られたデータは公表されているIC₅₀値と一致した。



様々なHDACアイソザイムを測定可能

高感度なHDAC-Glo™ は幅広いHDACアイソザイム（クラスI, II）を高感度に定量できる。細胞を用いたアッセイで生じる発光シグナルには様々なアイソザイム活性が混在します。

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
HDAC-Glo Assay			
細胞・酵素ベースアッセイシステム			
HDAC-Glo™ I/II Assay	10ml	G6420	72,000
	5 × 10ml	G6421	266,000
	100ml	G6422	351,000
HDAC-Glo™ I/II Screening	10ml	G6430	75,000
	5 × 10ml	G6431	277,000

付属品

HDAC-Glo™ I/II Control Substrate	10μl	G6550	43,000
Trichostatin A	10μl	G6560	17,000
HeLa Nuclear Extract	10μl	G6570	20,000

・10mlは96ウェル形式で100ウェル分（100μl/ウェル使用時）。

プロメガ資料：www.promega.co.jp/lit/hdacglo.html

その他のHDACアッセイ

酵素ベースアッセイシステム

SIRT-Glo™ Assay	10ml	G6450	72,000
	5 × 10ml	G6451	266,000
	100ml	G6452	351,000
SIRT-Glo™ Screening	10ml	G6470	75,000
	5 × 10ml	G6471	277,000

付属品

SIRT-Glo™ Control Substrate	35μl	G6460	43,000
Nicotinamide	30μl	G6540	12,000
HeLa Nuclear Extract	10μl	G6570	20,000

・10mlは96ウェル形式で100ウェル分（100μl/ウェル使用時）。

プロメガ資料：www.promega.co.jp/lit/sirtglo.html

GPCRシグナル

cAMP

発光

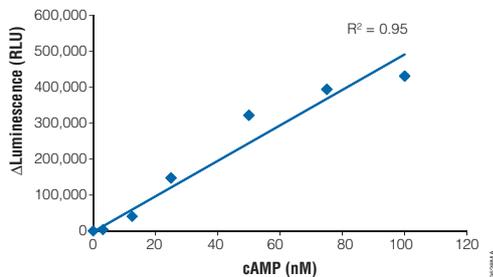
cAMP-Glo™ Max Assay

細胞内cAMPを発光法により高感度に検出



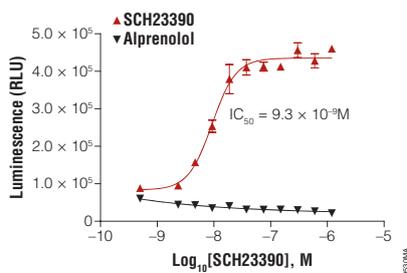
cAMP-Glo™ Max Assayは、細胞内のcAMPレベルを測定するための試薬で、発光法によるホモジニアスなハイスループットアッセイを可能にします。Gタンパク質共役型受容体（GPCR）におけるアゴニストまたはテスト化合物の影響によって変動する細胞内cAMP量をモニタリングします。アデニル酸シクラーゼと共役するGPCRは細胞内cAMPを増加あるいは減少させます。本アッセイは、cAMPがプロテインキナーゼAホロ酵素活性を刺激し、ルシフェラーゼ反応に利用可能なATP量を減少させ、それに伴い発光レベルが低下するという原理に基づいています。cAMP-Glo™ Max Assayは96、384または1536ウェルプレートでアッセイすることができます。テスト化合物で細胞を誘導した後、cAMPを遊離させるために細胞を溶解してプロテインキナーゼAを含むcAMP detection solutionを添加します。次にPKA反応を停止させ、ルシフェラーゼ反応により残存するATPを検出するKinase-Glo® Reagentを加えます。cAMP標準曲線を用いることにより発光レベルからcAMP濃度が決定されます。発光シグナルの半減期は4時間以上です。cAMP-Glo™ Max Assayは従来のcAMP-Glo™ Assayの改良型で、細胞溶解剤とcAMP反応バッファーがcAMP-Glo™ ONE Bufferに統合されました。この新しいフォーマットによりプロトコルの効率化が図られ、アッセイ完了までの時間を短縮することができます。新しいONE Bufferは5X濃度で供給されるため培養ボリュームを柔軟に設定できるようになりました。

- **迅速で簡便**：シンプルなホモジニアスフォーマット（AMP-Glo™ Max Assayでは細胞溶解およびcAMP検出が1ステップに統合 [約30分でアッセイ完了]）。
- **優れたシグナル/バックグラウンド比（S/B比）**：優れたS/B比（>200 [cAMP], >15 [細胞]）を示し、1536ウェルプレート以上のフォーマットにも簡単に変更可能。
- **柔軟性**：ONE Buffer: 5X濃度は細胞培養ボリュームの柔軟性を向上。
- **優れた発光技術を採用**：定評のあるUltra-Glo™ Recombinant Luciferaseを使用しており、蛍光化合物による干渉もありません（Non-RI）。

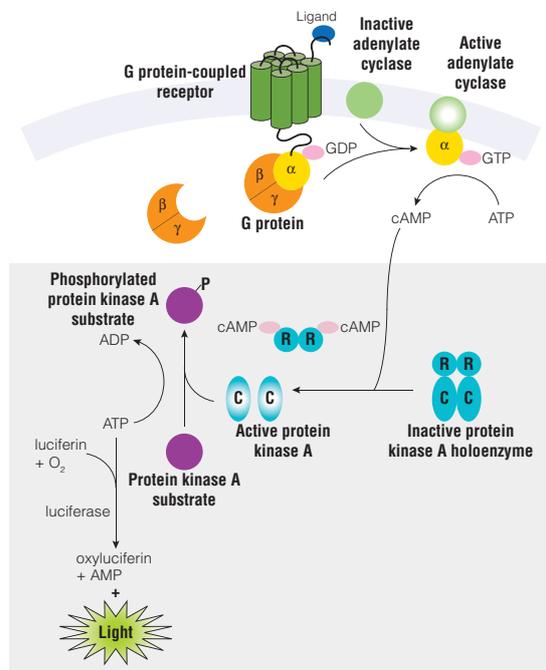


cAMPのタイトレーション

白色384ウェルプレートで表示濃度のcAMPを含む反応を調製し、cAMP-Glo™ Max AssayおよびGloMax®-Multi+ Detection Systemを用いて測定した。各ポイントは4データポイントの平均。



D1受容体を発現するHEK293細胞を用いたSCH23390のIC₅₀値の決定
白色384ウェルプレートに2,000個の細胞を加え、アゴニストSKF38393 (100nM)存在下で表示量のアンタゴニストSCH23390で処理した。ネガティブコントロール反応として、SCH23390の代わりにアルプレノロールを使用した。各ポイントは3データポイントの平均でエラーバーは標準偏差を示す。



cAMP-Glo™ Assayの原理の概略図

細胞内cAMP濃度の変化により、ヘテロ四量体として存在する不活性状態のcAMP依存性プロテインキナーゼ（PKA）が修飾され、調節サブユニット二量体から酵素活性を有する触媒サブユニット2個が遊離する。PKAの活性化は、キナーゼ反応におけるATP基質の減少によりモニターでき、残存するATPはルシフェラーゼ反応により定量できる。

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
cAMP-Glo™ Max Assay			
アッセイシステム			
cAMP-Glo™ Max Assay	2プレート分	V1681	56,000
	20プレート分	V1682	305,000
	10×20プレート分	V1683	お問い合わせ下さい

・表示のサイズは96ウェルまたは384ウェルプレートの場合
・バルク注文については別途お問い合わせください。

プロメガ資料：www.promega.co.jp/lit/campglo.html

GPCRシグナル

cAMP

発光

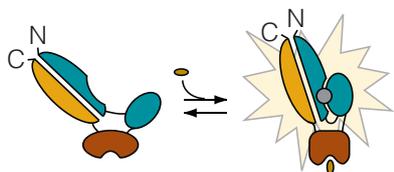
GloSensor™ cAMP Assay

組換えルシフェラーゼ センサーによる直接的なcAMPモニタリング

GloSensor™ cAMP Assayは、細胞内のcAMPレベルを測定する新しいアプローチを提供します。バイオセンサー遺伝子はホタルルシフェラーゼの内部にcAMP結合タンパク質の一部を挿入するための遺伝子改変が施されています。cAMPが結合すると、構造が変化して発光量が増加します。この生細胞アッセイはcAMPを通じたシグナル伝達のカイネティクスやモジュレーションの研究に最適です。

選択した細胞株で標的受容体およびバイオセンサーを一過性に発現させてGloSensor™ cAMP Assayを行います。また、バイオセンサーと受容体を安定に発現する細胞株を調製して実施することもできます。プロトコルはシンプルで、細胞をGloSensor™ cAMP Reagentで事前に約2時間平衡化します。その後、特異的なアゴニスト/アンタゴニストあるいは活性の未知な化合物で処理し、10~30分後に発光を測定します。それ以外の試薬添加や、手作業は不要です。インジェクターが付属する標準的なルミノメーターで測定できます。GloSensor™ cAMP Reagentは、本アッセイでの使用に必要です。GloSensor™ Plasmidは2種類のバイオセンサーバリエーションごとに20Fと22Fをご用意しています。多くの用途においてpGloSensor™-22Fを最初の選択肢として推奨します（詳細についてはプロトコル TM076を参照ください。）

- シンプルなアッセイ：HTS や ultra HTS (例：3456- ウェル形式) に理想的な 0 ステップアッセイ。
- リアルタイムの測定：処理後 15 分で cAMP レベルを検出。
- より生体反応に近いデータ：非溶解性の生細胞アッセイによるカイネティックなデータ取得。

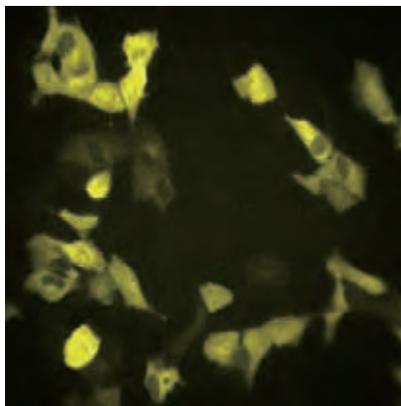


N-359-544-R11βB-4-355-C

77070A

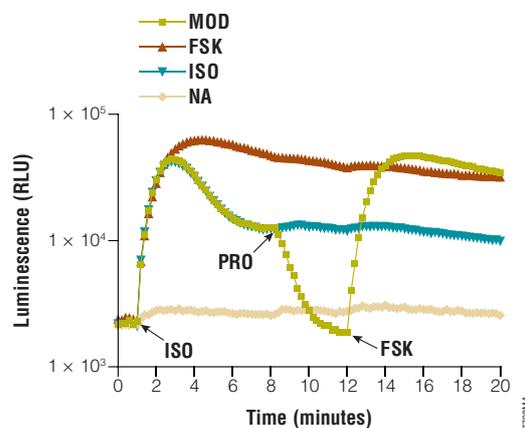
GloSensor™ cAMP Assay の発光原理

Allosteric (アロステリック型) 改変ルシフェラーゼ遺伝子：cAMP が結合するドメイン (R11 β B) の構造変化により発光シグナルが調節される。



HEK293 での cAMP モニタリング

GloSensor™ cAMP タンパク質を一過性に発現する HEK293 細胞のイメージング。イメージングは LV200 (オリンパス社) を用いた。



アロステリック cAMP バイオセンサー

生細胞 (37°C) におけるシグナルのカイネティクスと可逆性を示す。cAMP バイオセンサーを一過性に発現する HEK293 細胞を 10mM イソプロテレノール (ISO) または 10mM フォルスコリン (FSK) それぞれ単独で処理した。変調を加える細胞は、10μM ISO、10μM プロプラノール (PRO) および 10μM FSK で連続的に処理した (n=3)。Fan, F. *et al.* (2008) *ACS Chem. Biol.* 3, 346-51. より許可を得て転載した。

製品名 サイズ カタログ番号 価格 (¥)

GloSensor™ cAMP Assay

ベクターおよび安定発現細胞株

pGloSensor™-22F cAMP Plasmid NEW	20μg	E2301	107,000
pGloSensor™-20F cAMP Plasmid	20μg	E1171	107,000
GloSensor™ cAMP HEK293 Cell Line	2 バイアル	E1261	852,000

アッセイ試薬

GloSensor™ cAMP Reagent	1 vial (25mg*)	E1290	53,000
	1 vial (250mg*)	E1291	245,000

* 25mg は 384 ウェル形式で 817 ウェル分。

※製品購入における注意点：GloSensor™ cAMP Assay の使用は非営利組織 (大学、公的研究機関など)、営利組織にかかわらず、ライセンスプログラムの内容 (www.promega.co.jp/license/) をご確認ください。

プロメガ資料： www.promega.co.jp/lit/glosensor.html

細胞外来マーカー検出システム選択ガイド（発光レポーターアッセイ）※1

製品名	フォーマット	標的分子	ホモジニアス	シグナル安定性	感度	ページ
ルシフェラーゼ（ホタル・ウミシイタケ・クリックビートル）						
Dual-Glo™ Assay System	デュアルアッセイ	ホタル/ウミシイタケ	○	約 2 時間 / 約 2 時間	○	22
Dual-Luciferase® Reporter Assay System			×	約 15 分間 / 約 2 分間	◎	22
Chroma-Glo™ Assay System		○	30 分以上 / 5 時間以上	△	32	
ONE-Glo™ Assay System	シングルアッセイ	ホタル	○	約 50 分間	◎	23
Bright-Glo™ Assay System			○	約 30 分間	◎	23
Steady-Glo® Assay System			○	約 5 時間	○	23
Luciferase Assay System			×	約 15 分間	◎	23
Renilla-Glo™ Assay System 			○	約 60 分間	○	23
Renilla Luciferase Assay System	×	約 2 分間	◎	23		
VivoGlo™ Luciferin, In Vivo Grade	In Vivo イメージング	ホタル	□ ^{※4}	—	—	26
EnduRen™ Substrate ^{※2}	モニタリング / In Vivo イメージング	ウミシイタケ	○ ^{※3※4}	24 時間以上 ^{※5}	○	25, 26
ViviRen™ Substrate ^{※2}			○ ^{※3※4}	数時間 ^{※5}	◎	25, 26

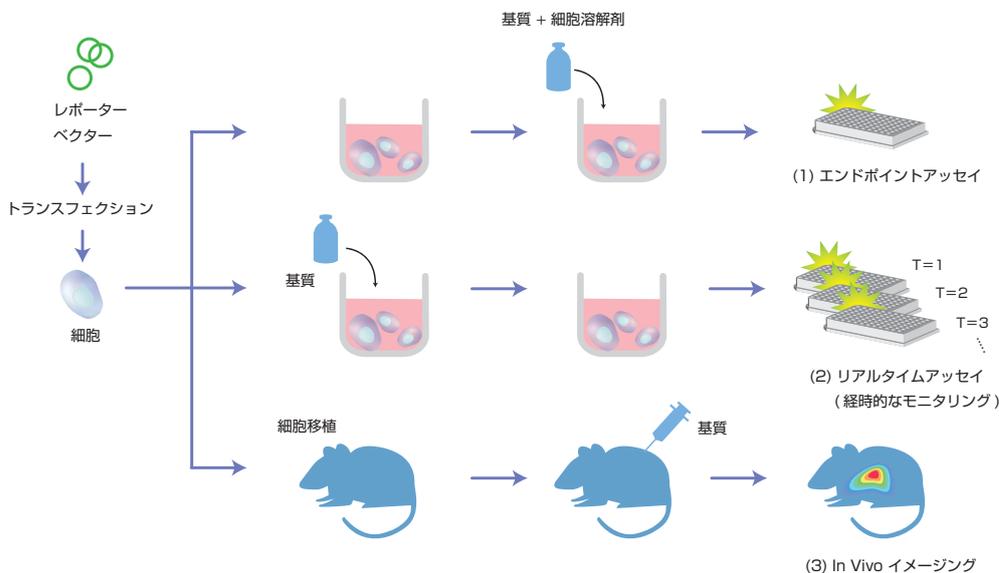
※ 1 レポーターアッセイにはレポーターベクターが必要です。ベクターの詳細については 27-30 ページをご覧ください。

※ 2 培養細胞用と In Vivo イメージング用の 2 タイプがございます。

※ 3 試薬は予め培地に溶解

※ 4 動物個体に静脈注射 / 腹腔内注射

※ 5 培養細胞用の場合



ルシフェラーゼレポーターの測定またはイメージング

ルシフェラーゼ活性の検出試薬には 3 つのタイプがあります。(1) 一般的なエンドポイントアッセイでは、細胞を溶解して内部のルシフェラーゼと基質が反応。(2) リアルタイムアッセイでは、予め培地に加えられた基質が細胞内に透過し、細胞内でルシフェラーゼ発光反応が起る。細胞を破壊しないため、同じサンプルプレートを経時的に測定することで、ルシフェラーゼ発光をモニタリングすることができる。また他の細胞内マーカーアッセイシステムと組み合わせたマルチアッセイも可能。(3) In Vivo イメージングでは、ルシフェラーゼ遺伝子を導入した細胞をマウスなどの動物個体に移植することで、がん細胞の転移や薬物の影響などを経時的に観察することができる。

ルシフェラーゼ：デュアルアッセイ

発光

Dual Luciferase Assay Systems

ホタル・ウミシイタケルシフェラーゼを連続測定するデュアルアッセイ

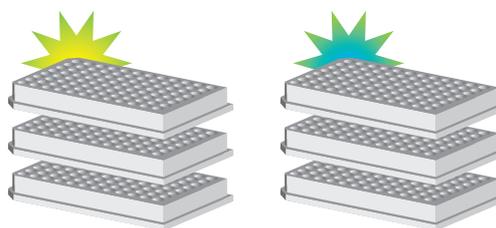
デュアルルシフェラーゼアッセイ（エンドポイント）

Dual-Glo™ Luciferase Assay System（長時間発光タイプ）

ホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を導入した哺乳動物細胞から得られる2種類のルシフェラーゼ活性を、安定な発光シグナル（約2時間）として連続定量するための試薬です。シンプルなホモジニアスアッセイ方式（添加→測光）を採用しており、特に96、384プレートを用いた多検体のアッセイに最適です。Dual-Glo™ Luciferase Reagentは、培地の除去、細胞洗浄を行わずに、培地中の細胞に直接添加することができます。この試薬は、細胞を溶解するとともに、ホタルルシフェラーゼの基質を供給します。次に加えるDual-Glo™ Stop & Glo® Reagentは、ホタルルシフェラーゼによる発光を瞬時に抑え、ウミシイタケルシフェラーゼの基質としても働きます。デュアルアッセイにより、実験用レポーターのデータを内部コントロール用レポーターのデータで補正し、実験間のバラツキを低減することができます。

Dual-Luciferase Reporter Assay System（高感度タイプ）

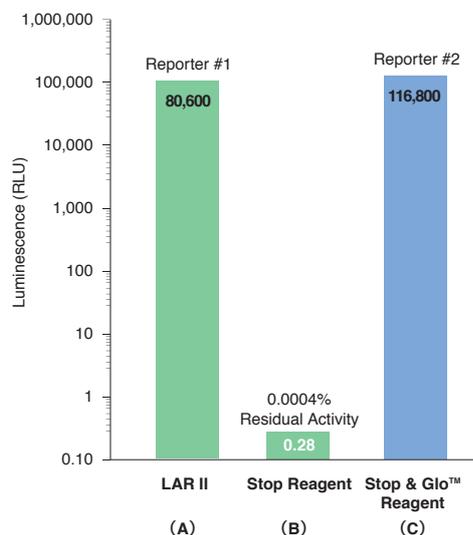
細胞ライセートなど1つのサンプルから2種類のルシフェラーゼ（ホタルおよびウミシイタケ）を短時間に連続して定量するためのシステムです。このレポーターシステムはattomole ($<10^{-16}$) レベルの検出感度と優れた直線性を示します。アッセイはPassive Lysis Bufferで細胞ライセートを調製した後にLuciferase Assay Reagent II (LAR II)、続いてStop & Glo® Reagentを同じサンプルチューブに添加し、ホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼの発光を測定します。



2ステップ Dual-Glo™ Luciferase Assay

ステップ1: 培地を含む細胞にDual-Glo™ Luciferase Reagentを分注。10分後測定開始（2時間後まで測定可能）

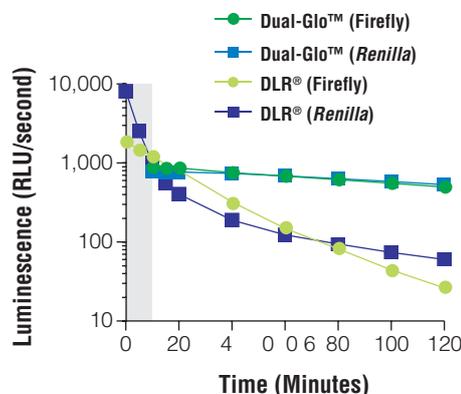
ステップ2: Dual-Glo™ Stop & Glo® Reagentを同じプレートに分注。10分後測定開始（2時間後まで測定可能）



Stop&Glo Reagentによる消光効果（DLR）

ホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼベクターを2重トランスフェクションしたCHO細胞ライセートを用いた。

(A) LAR II（ホタルの基質を含む）の添加によるホタルルシフェラーゼの発光（B）Stop Reagent（消光効果を示すためにStop & Glo® Reagentからウミシイタケの基質を除いたもの）によりホタルの発光はほとんど消失する。(C) Stop & Glo® Reagent（ウミシイタケの基質を含む）によりウミシイタケが発光。



Dual-Glo™ および Dual-Luciferase (DLR) における2つのルシフェラーゼ発光シグナルの減衰比較

製品名

サイズ カタログ番号 価格(¥)

Dual-Glo™ Luciferase Assay System

デュアルルシフェラーゼアッセイシステム（長時間発光タイプ）

Dual-Glo™ Luciferase Assay System	10ml	E2920	35,000
	100ml	E2940	281,000
	10 × 100ml	E2980	お問い合わせ下さい

・10mlは96ウェルプレートで130ウェル分。
・バルク注文については弊社までお問い合わせください。

プロメガ資料：www.promega.co.jp/lit/dualglo.html

Dual-Luciferase Reporter Assay System

デュアルルシフェラーゼアッセイシステム（高感度タイプ）

Dual-Luciferase® Reporter Assay System	100回分	E1910	29,000
Dual-Luciferase® Reporter Assay System 10-Pack	1000回分	E1960	232,000
Dual-Luciferase® Reporter 1000 Assay System	1000回分	E1980	219,000

・バルク注文については弊社までお問い合わせください。

プロメガ資料：www.promega.co.jp/lit/dualluc.html

ルシフェラーゼ：シングルアッセイ

発光

Single Luciferase Assay Systems

ホタルまたはウミシイタケルシフェラーゼを簡便に測定

シングル-ホタルルシフェラーゼアッセイ（エンドポイント）

ONE-Glo™ Luciferase Assay System

より高感度、頑健に哺乳動物細胞で発現したルシフェラーゼを測定するためのホモジニアスアッセイシステムで、ハイスルーブット、ウルトラハイスルーブットアプリケーションに最適です。ONE-Glo™ Assayには新しく開発されたルシフェラーゼの基質5'フッ化-ルシフェリンが含まれているため、試薬の安定性、サンプルに含まれる成分に対する寛容性が増大しました。また、標準的なルシフェラーゼアッセイ試薬よりも硫黄臭が低減され、使いやすくなっています。これらの特長により、他のレポーターアッセイを多検体で行う際の不便さを低減することができ、発光パフォーマンスが確実に発揮されます。

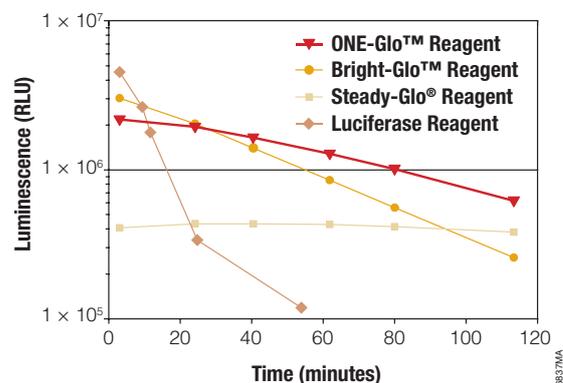
- ・よりシンプルな最適化：頑健なパフォーマンス、硫黄臭の低減、保存条件の改善などにより使い易く効率的なアッセイを実現
- ・室温または4℃保存も可能：室温または4℃での安定性増加により、日々の使用にも簡便な保存が可能
- ・定量精度の増加：ONE-Glo™ Reagentは混和や分注の条件に対して寛容であるため、再現性が向上（384, 1536 ウェルプレートに最適）
- ・より明るく長いシグナル：バッチおよび連続プロセスに最適化
- ・サンプルに含有する成分による影響を低減：ONE-Glo™ Assayの新しいケミストリーは他のルシフェラーゼアッセイよりも培地、フェノールレッド、ルシフェラーゼ阻害剤に寛容

Steady-Glo Luciferase Assay System

シングルタイプで最も長い発光時間を示します（半減期は約5時間）。96または384ウェルプレートに最適化されており、1時間に数千サンプルを処理する能力と高い再現性を示します。細胞を洗浄する必要がなく、培地を含む細胞に1種類の試薬（細胞を溶解する作用も併せ持ちます）を加えるホモジニアスタイプの試薬です。

Bright-Glo™ Luciferase Assay System

グロータイプで最も優れた感度（Steady-Glo®の約7～8倍）を示し、発光時間（光の半減期は約30分）も中程度の長さです。そのためCCDカメラによる発光の検出や比較的弱いプロモーターを用いたアッセイ系にも対応が可能となりました。96または384ウェルプレート用に最適化されたホモジニアスタイプの試薬です。



長時間発光タイプのルシフェラーゼ試薬の発光比較

96ウェルプレートに1ウェルあたり50μl分注した精製ルシフェラーゼを含むサンプルに各ルシフェラーゼアッセイ試薬50μl（14.9ng/ml with 0.1% Prionex®）を加えた。3分後から測光（1ウェルあたり1.0秒）を開始し、約2時間まで定期的に測定を続けた。全ての変動係数は<3%；（n=3）

製品名 サイズ カタログ番号 価格（¥）

Glo Type Luciferase Assay System

ホタル ルシフェラーゼ アッセイシステム（長時間発光タイプ）

ONE-Glo™ Luciferase Assay System	10ml	E6110	20,000
	100ml	E6120	129,000
	1L	E6130	お問い合わせ下さい

Bright-Glo™ Luciferase Assay System	10ml	E2610	19,000
	100ml	E2620	104,000
	10X100	E2650	お問い合わせ下さい

Steady-Glo® Luciferase Assay System	10ml	E2510	17,000
	100ml	E2520	93,000
	10X100ml	E2550	お問い合わせ下さい

- ・10mlは96ウェルプレートで100ウェル分。
- ・バルク注文については弊社までお問い合わせください。

プロメガ資料：www.promega.co.jp/lit/oneglo.htmlwww.promega.co.jp/lit/brightglo.htmlwww.promega.co.jp/lit/steadyglo.html

その他のルシフェラーゼ定量試薬

ホタル ルシフェラーゼ アッセイシステム（高感度タイプ）

Luciferase Assay System	100回分	E1500	15,000
Luciferase Assay System with Reporter Lysis Buffer	100回分	E4030	17,000
Luciferase Assay System, 10-Pack	1000回分	E1501	92,000

ウミシイタケ ルシフェラーゼ アッセイシステム（長時間発光タイプ）

Renilla-Glo™ Luciferase Assay System NEW	10ml	E2710	20,000
	100ml	E2720	105,000

ウミシイタケ ルシフェラーゼ アッセイシステム（高感度タイプ）

Renilla Luciferase Assay System	100回分	E2810	18,000
	1000回分	E2820	94,000

ONE-Glo™ + Tox Luciferase Reporter and Cell Viability Assay

レポーターと細胞生存性のマルチアッセイ

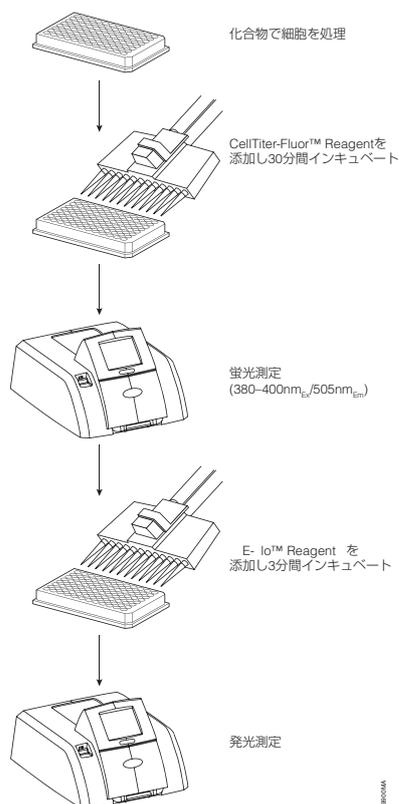


励起波長：400nm
蛍光波長：505nm

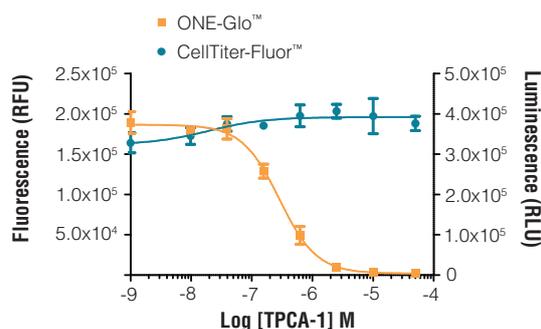
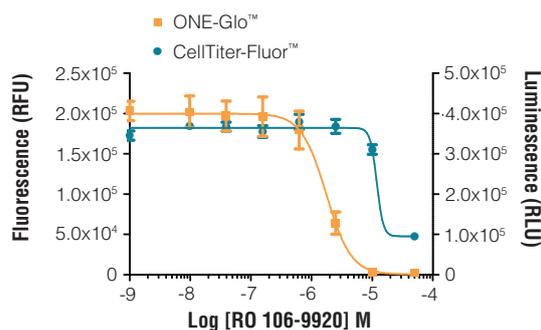
ONE-Glo™ + Tox Assayはルシフェラーゼレポーターアッセイと細胞生存性マーカー測定を組み合わせたアッセイで、細胞の健全性を考慮に入れることでレポーター遺伝子発現をより正確に理解することができます。また、恒常的な発現プロモーターを有するホタルルシフェラーゼレポーターベクターを使用することでタンパク質の発現効率と細胞生存性を加味したトランスフェクション条件の最適化にも利用することができます（31ページ 左下図参照）。本アッセイは試薬を添加する2ステップの操作だけで完了し、プレートの同一ウェル内で2つのアッセイが完結するため、各アッセイを別々に実施する必要がありません。

アッセイの第一段階では、実験処理後の培養細胞群における生細胞の相対数を非溶解性の蛍光アッセイ（CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay：7ページ参照）で測定します。CellTiter-Fluor™ Assayは、生細胞内に常在するプロテアーゼ活性を細胞生存性マーカーとして測定します。細胞透過性の蛍光基質がインтактな細胞に入り込むと生細胞プロテアーゼにより切断され、生細胞数に比例した蛍光シグナルを生成します。この生細胞プロテアーゼは細胞膜の完全性が失われ培地中に漏出すると不活性化されます。アッセイの第二段階では、発現したホタルルシフェラーゼ酵素の測定にONE-Glo™ Luciferase Assay System（23ページ参照）を用います。ハイスループットあるいはウルトラハイスループットなアプリケーションに対応するために新規な fluoroluciferin substrateが採用されており、試薬の安定性が向上し、サンプルに含まれる成分に対する耐性が得られます。また、標準的なルシフェラーゼアッセイ試薬よりも硫黄臭が抑えられています。

- ・効率的：細胞生存性とルシフェラーゼ遺伝子発現を同一アッセイウェル内で測定。単一ウェル内の細胞で複数項目のデータ取得。
- ・より生物学的な情報を取得：細胞生存性を背景としたレポーター遺伝子発現の理解
- ・簡便：アッセイはシンプルで連続的な“添加 - 混和 - 測定”フォーマットを採用
- ・高い柔軟性と容易な自動化：各アッセイ試薬の容量はサンプル処理量に合わせてスケールを変更でき、最大1536ウェルフォーマットまで自動化可能



ONE-Glo™ + Tox Luciferase Reporter and Cell Viability Assayの操作概要



NF-κB 阻害剤プロファイル

細胞生存性についてのコントロールを組み入れることにより、レポーター発現に影響を与える毒性化合物を同定可能。用量依存的に NF-κB レポーター遺伝子発現に影響しながら、異なる細胞毒性プロファイルを示す2つの化合物の例。RO 106-9920は濃度が高いほど毒性を示す一方 TPCA-1化合物は毒性を示さなかった。

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
ONE-Glo™ + Tox Luciferase Reporter and Cell Viability Assay			
マルチアッセイ			
ONE-Glo™ + Tox Luciferase Reporter and	1プレート分	E7110	29,000
Cell Viability Assay	10プレート分	E7120	183,000
・サイズは 96 ウェルまたは 384 ウェルプレートの場合			

プロメガ資料：www.promega.co.jp/li/onetoxglo.html

ルシフェラーゼ：モニタリング（細胞）

発光

Luciferase Monitoring Substrates

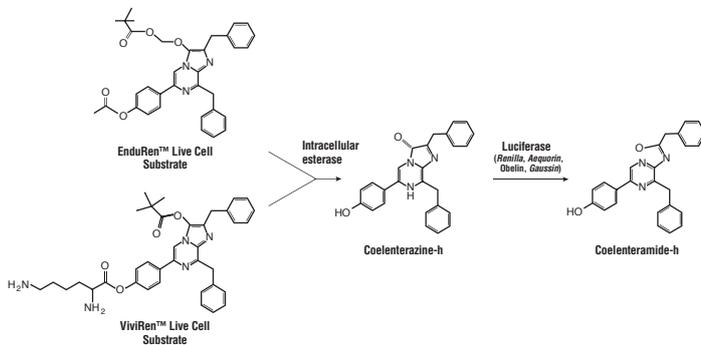
ウミシイタケルシフェラーゼ発現を生細胞でモニタリング

シングル-ウミシイタケルシフェラーゼアッセイ（リアルタイム）

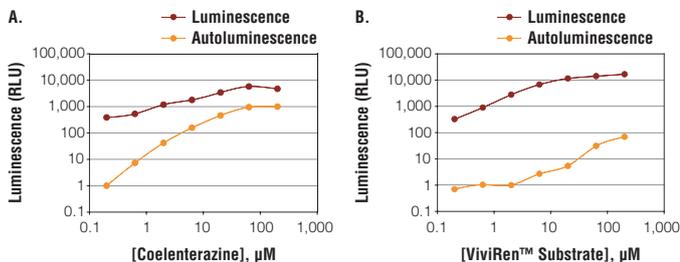
EnduRen™ および ViviRen™ Live Cell Substrate

生細胞の状態でもウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定することができる試薬です。標準的なルシフェラーゼレポーターアッセイは細胞溶解後に定量を行うため（エンドポイントアッセイ）、同一サンプルを用いた経時的なアッセイは不可能でした。これらの基質はセレンテラジンに保護基を付加し、酸化を受けるサイトをブロックします。この基質は細胞内に透過し、生細胞内のエステラーゼにより保護基が外れて発光が開始されるため、死細胞や溶解した細胞からシグナルは生じません。EnduRen™ はウミシイタケルシフェラーゼ活性を少なくとも24時間観察できます。また、野生型のセレンテラジンに比べ、最大10倍のシグナルバックグラウンド比を示します。ViviRen™ は野生型セレンテラジンよりも3～5倍の発光レベルを示します。自家発光が極めて低く抑えられているため、セレンテラジンに比べて最大100倍のシグナル/ノイズ比を実現できます。

- ・動的なレポーター分析が可能：テスト化合物のリアルタイム反応プロファイルを作製
- ・優連続的なアッセイ&スクリーニング：1つの細胞集団を用いた反復測定を通じて迅速に定量パラメータを得ることができ、アッセイごとに試薬を添加する必要が無い（予め培地に溶かすだけ）ので、スループットが増加
- ・マルチアッセイに最適：同一サンプルを用いた細胞溶解アッセイとのマルチアッセイによりダイナミックな実験が可能
- ・高いシグナル/バックグラウンド比：発現レベルの低いレポーター検出や BRET でも信頼性のある測定が可能

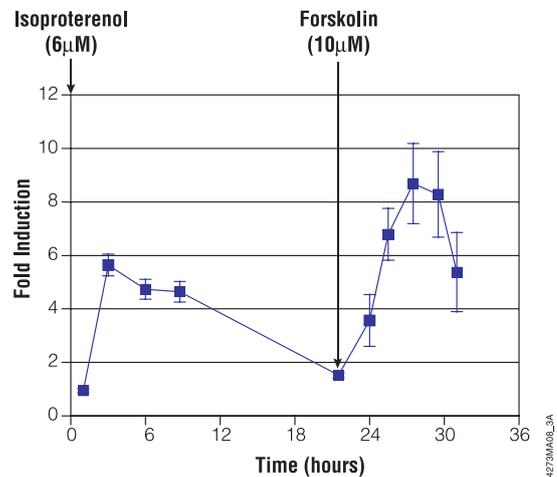


生体内における ViviRen™ Live Cell Substrate の反応



自己発光が抑えられた ViviRen™ Substrate の発光シグナル

ウミシイタケルシフェラーゼを安定発現する CHO を用いて表示の基質濃度で発光を測定した。自己発光についてはトランスフェクションを行っていない CHO 細胞を用いた。CHO 細胞を培養する各ウェル内で、**A**：セレンテラジンまたは **B**：ViviRen™ Substrate のタイトレーションを行った。



EnduRen™ を用いた 24 時間以上のリアルタイム測定

CRE 応答エレメントおよび PEST 分解配列を有するウミシイタケルシフェラーゼベクターをトランジェントに HEK293 細胞にトランスフェクションし、24 時間以上にわたりイソプロテレノールおよびフォルスコリンで連続的に処理した。細胞に EnduRen™ Live Cell Substrate を添加し、16 時間後に 6 μM イソプロテレノールで処理した後、20 時間後に 10 μM フォルスコリンで処理した。各データポイントは N=6。

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
Live Cell Substrates			
ウミシイタケルシフェラーゼ モニタリング基質			
EnduRen™ Live Cell Substrate	0.34mg	E6481	24,000
	3.4mg	E6482	152,000
	34mg	E6485	お問い合わせ下さい
ViviRen™ Live Cell Substrate	0.37mg	E6491	26,000
	3.7mg	E6492	158,500
	37mg	E6495	お問い合わせ下さい

- ・ E6481 および E6491 は培地 10ml（終濃度 60 μM）に充分量です。
- ・ バルク注文については別途お問い合わせ下さい。

プロメガ資料：

EnduRen™: www.promega.co.jp/lit/enduren.html

ViviRen™: www.promega.co.jp/lit/viviren.html

ルシフェラーゼ：イメージング（個体）

発光

In Vivo Imaging Substrates

動物個体のイメージングに最適の発光基質

ホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼ検出（イメージング）

In Vivo Imaging Substratesは動物個体のin vivo イメージングに最適のルシフェラーゼ基質です。レポーターであるホタルルシフェラーゼあるいはウミシイタケルシフェラーゼの発現を観察するルシフェリン、セレンテラジンやカスパーゼ、 β ガラクトシダーゼの活性を検出する修飾ルシフェリンなども揃えています。エンドトキシンフリーで、エンドトキシンによる潜在的な影響を排除することができます。

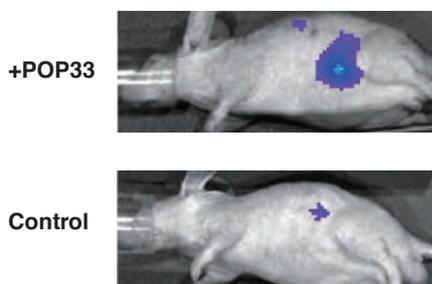
VivoGlo™ Luciferin, In Vivo Grade: 北アメリカホタル (*Photinus pyralis*) およびその他の甲虫ルシフェラーゼは、細胞内やモデル動物内で発光性レポーターとして汎用されています。VivoGlo™ LuciferinはD-Luciferinのカリウム塩で、適切なモデルで使用了場合に発光基質として使用することができます。

EnduRen™ & ViviRen™ In Vivo substrates: 人為的に改変されたセレンテラジンをベースとした化合物で、本来酸化される部位が防護されています。これらの修飾は基質の分解および自己発光を最低限に抑えるためにデザインされています。マウスモデルにおけるin vivo イメージングで使用了場合、ネイティブなセレンテラジンに比べViviRen™ Substrateはより明るい光を生じ、EnduRen™ Substrateは長時間にわたる発光を示します。

VivoGlo™ Caspase-3/7 Substrate: カスパーゼ-3およびカスパーゼ-7が認識するDEVDペプチド配列で保護されたホタルルシフェラーゼ基質です。カスパーゼ-3またはカスパーゼ-7の活性化によりDEVDペプチドがアミノルシフェリンより切除されます。ホタルルシフェラーゼを含む適切なモデル動物で使用するれば、遊離されたアミノルシフェリンはルシフェラーゼと反応して検出可能な光を生じます。

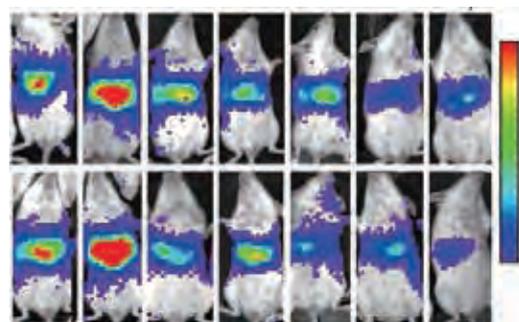
VivoGlo™ Luciferin- β -Galactoside Substrate: 本製品は汎用される β -ガラクトシダーゼレポーター酵素の基質で、In Vivo イメージングに使用することができます。この基質は、 β -ガラクトシダーゼにより、ルシフェリンとガラクトースに分解されます。生成したルシフェリンは、ホタルルシフェラーゼの反応で利用され光を生じます。

- **最高品質の基質:** エンドトキシンによるアッセイへの潜在的な干渉を排除
- **品質保証:** ほとんどの製品は、セプタにより密閉された褐色バイアルに封入され、品質を高度に保つとともに、希釈が容易で、イメージング実験に最適です。製品は正確に分注されているため、基質を再度量る必要がありません
- **柔軟性と利便性:** 様々な実験デザインに対応した複数のパッケージサイズ



VivoGlo™ Substrate による In Vivo でのカスパーゼイメージング

カスパーゼ-3の活性を増加させるプロドラッグ (POP33) の影響を調べるために、ルシフェラーゼを発現する腫瘍細胞を導入したマウスの腹腔内に VivoGlo™ Caspase-3/7 substrate を注射し、活性化カスパーゼをイメージング (IVIS: Xenogen Corp) した。写真は京都大学医学研究科 近藤科江先生のご好意によるものです。



ルシフェリンを用いたマウス個体の In Vivo イメージング

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
In Vivo Imaging Substrates			
ホタル・ウミシイタケルシフェラーゼ In Vivo イメージング基質			
VivoGlo™ Luciferin, In Vivo Grade	50mg	P1041	94,000
	1g		お問い合わせ下さい
EnduRen™ In Vivo Renilla Luciferase Substrate	0.34mg	P1111	24,000
	3.4mg	P1112	152,000
ViviRen™ In Vivo Renilla Luciferase Substrate	0.37mg	P1231	26,000
	3.7mg	P1232	158,500
VivoGlo™ Caspase-3/7 Substrate (Z-DEVD-Aminoluciferin, Sodium Salt)	50mg	P1781	232,000
	5 × 50mg	P1782	808,000
VivoGlo™ Luciferin- β -Galactoside Substrate (6-O- β -Galactopyranosyl-Luciferin)	50mg	P1061	176,000
	250mg	P1062	574,000

プロメガ資料：www.promega.co.jp/lit/vivoglo.html

VivoGlo™ In Vivo Imaging Substrates は、in vivo 生物発光イメージングアプリケーションにおいて、Xenogen Corporation および Caliper Life Sciences との協力をもとに提供しています。

ルシフェラーゼ（レポーターベクター）

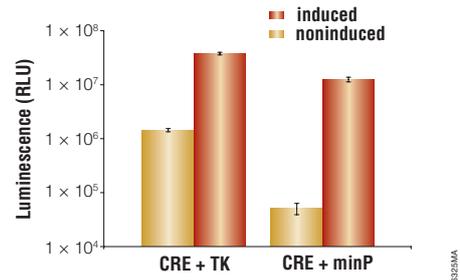
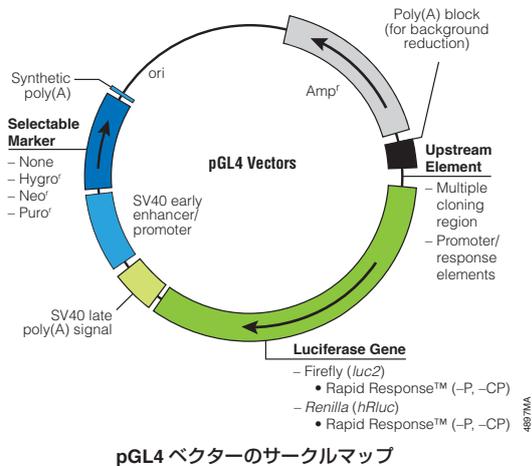
転写活性

pGL4 Luciferase Vectors

細胞内の変化をより正確に伝えるレポーターベクター

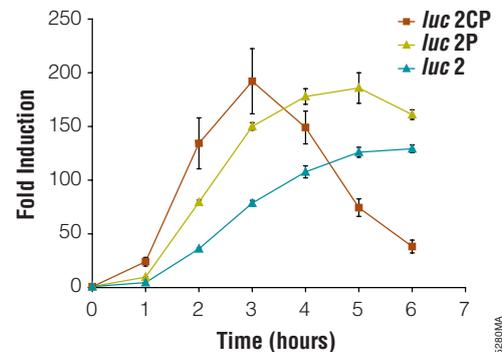
pGL4 Vectorシリーズは哺乳動物細胞における最適な発現を可能にする次世代のルシフェラーゼレポーターベクターで、最新のレポーター遺伝子（ホタル：*luc2*およびウミシイタケ：*hRluc*）が組み込まれています。レポーター遺伝子およびベクターバックボーンの両方からコンセンサス転写調節配列の多くが除かれ、変則的な転写作用によるリスクを最低限に抑えます。レポーターの分解を促進するhPESTおよびhCL1配列はレポーターの分解を促進することにより反応性が向上します。さらに、*luc2P*遺伝子上流に最小限のプロモーター（minP）を配した新しいベクターは応答配列のクローニングに適しています。NF- κ B-RE、CRE、NFAT-RE、SRE、SRF-RE、MMTV-LTR、GAL4UASの各応答配列を組み込んだレポーターベクターも加わりました。

- **高いシグナル-バックグラウンド比**：ホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼの高レベル発現、低バックグラウンドを実現
- **変則的発現の低減**：レポーター遺伝子だけでなく、ベクターバックボーンからもほとんどの転写因子結合サイトが除去され、より信頼性が向上
- **応答性の改良**：レポーターの分解を促進させる配列により、迅速で反応性の高いレポーター実験が可能
- **シグナル伝達解析にも最適**：各種シグナル応答配列が組み込まれたベクターを揃え、任意の応答配列導入用のベクターには最適化された最小プロモーター（+minP）を付加
- **幅広い選択肢**：様々なプロモーター、薬剤選択マーカー、分解配列を選択できます。



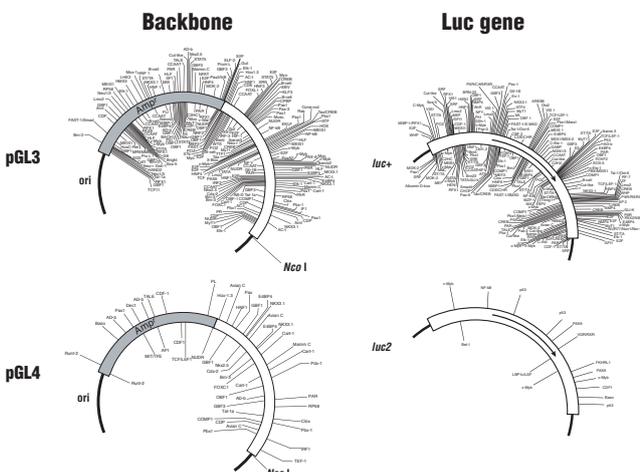
minPを含むpGL4の高い誘導倍率

luc2P レポーター遺伝子上流に CRE-TK (CRE: cAMP 応答配列, TK: HSV-TK プロモーターの一部)、または CRE-minP を含む pGL4 ベクターをそれぞれ内部標準用ベクターとともに HEK293 細胞にトランスフェクションし、インプロテノール添加による応答をレポーターアッセイにより測定した。



不安定化ルシフェラーゼによる反応性の向上と最大誘導到達時間の短縮

luc2：ホタルルシフェラーゼ、*luc2P*；hPEST 配列を付加したホタルルシフェラーゼ、*luc2CP*；hCL1、hPEST 配列を付加したホタルルシフェラーゼ。インプロバノール/Ro-20-1724による cAMP 応答配列 (CRE) の反応をモニタリングした。



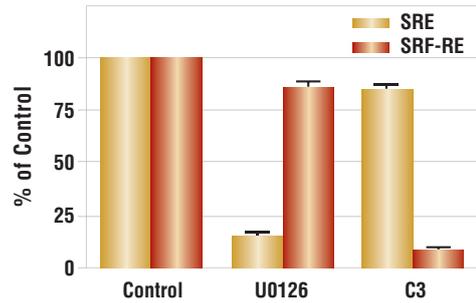
変則的な発現要因となるコンセンサス配列の旧型 pGL3 と pGL4 の違い

ルシフェラーゼ（レポータベクター）

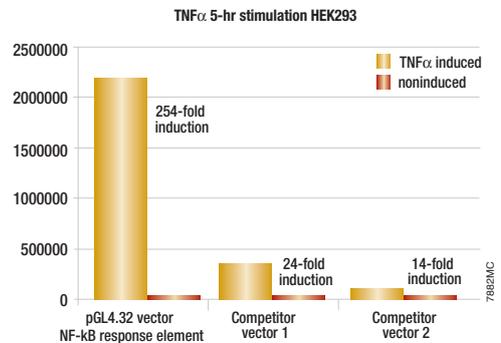
シグナル伝達

pGL4 ベクターの応答エレメント

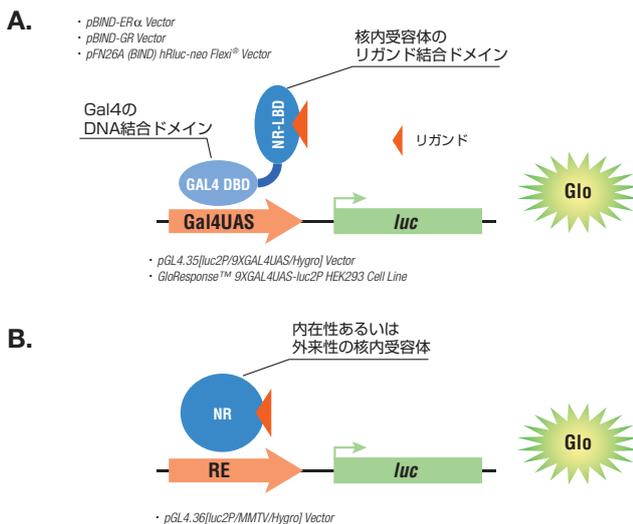
ベクター	ベクター 応答エレメント	シグナル経路
pGL4.29[<i>luc2P</i> /CRE/Hygro] Vector (カタログ番号 E8471)	cAMP 応答エレメント (cyclic AMP Response Element; CRE)	cAMP/PKA
pGL4.30[<i>luc2P</i> /NFAT-RE/Hygro] Vector (カタログ番号 E8481)	NFAT 応答エレメント (Nuclear Factor of Activated T-Cells Response Element; NFAT-RE)	カルシウム / カルシニウリン
pGL4.35[<i>luc2P</i> /9X GAL4UAS/Hygro] Vector (カタログ番号 E1370)	GAL4 上流活性化配列 (GAL4 upstream activating sequence; GAL4UAS)	多様 (GAL4-DNA 結合ドメインによる結合と活性化を要する)
pGL4.32[<i>luc2P</i> /NF-κB-RE/Hygro] Vector (カタログ番号 E8491)	NF-κB 応答エレメント (Nuclear Factor κB Response Element; NF-κB-RE)	NF-κB
pGL4.33[<i>luc2P</i> /SRE/Hygro] Vector (カタログ番号 E1340)	血清応答配列 (Serum Response Element; SRE)	MAPK/ERK
pGL4.34[<i>luc2P</i> /SRF-RE/Hygro] Vector (カタログ番号 E1350)	血清応答因子 応答配列 (Serum Response Factor Response Element; SRF-RE)	RhoA
pGL4.36[<i>luc2P</i> /MMTV/Hygro] Vector (カタログ番号 E1360)	マウス乳癌ウイルス末端反復配列 (Murine Mouse mammary Virus Long Terminal Repeat; MMTV-LTR)	アンドロゲン受容体、グルココルチコイド受容体を含むいくつかの核内受容体



pGL4 に含まれる SRE と SRF-RE の明瞭な応答性の違い
HEK293 に SRE-*luc2P* または SRF-RE-*luc2P* を含むベクターとウミシイタケレポーターベクターをコトランスフェクションし、U0126 (MEK 阻害剤) または C3 Transferase (RhoA 阻害剤) で前処理し、SRE は PMA、SRF は FBS で誘導した。



NF-κB 応答配列を有する pGL4 と他社ベクターとの比較



核内受容体によるシグナル解析のための2つのアプローチ
A: ワン-ハイブリットシステム、**B:** アンドロゲン受容体、グルココルチコイド受容体などが結合することが知られているマウス乳癌ウイルス (MMTV) 末端反復配列を利用。

製品名 サイズ カatalog番号 価格 (¥)

pGL4 Response Element Vectors			
pGL4 転写因子応答配列			
pGL4.29[<i>luc2P</i> /CRE/Hygro] Vector	20µg	E8471	68,000
pGL4.30[<i>luc2P</i> /NFAT-RE/Hygro] Vector	20µg	E8481	68,000
pGL4.32[<i>luc2P</i> /NF-κB-RE/Hygro] Vector	20µg	E8491	68,000
pGL4.33[<i>luc2P</i> /SRE/Hygro] Vector	20µg	E1340	68,000
pGL4.34[<i>luc2P</i> /SRF-RE/Hygro] Vector	20µg	E1350	68,000
pGL4.35[<i>luc2P</i> /9XGAL4UAS/Hygro] Vector	20µg	E1370	68,000
pGL4 核内受容体応答配列			
pGL4.31[<i>luc2P</i> /Gal4UAS/Hygro] Vector	20µg	C9351	68,000
pGL4.36[<i>luc2P</i> /MMTV/Hygro] Vector	20µg	E1360	68,000
pGL4 任意応答配列導入用			
pGL4.24 [<i>luc2P</i> /minP] Vector	20µg	E8421	68,000
pGL4.27 [<i>luc2P</i> /minP] Vector	20µg	E8451	68,000
安定発現細胞株			
GloResponse™ NF-κB-RE- <i>luc2P</i> HEK293 Cell Line	2 バイアル	E8520	761,000
GloResponse™ CRE- <i>luc2P</i> HEK293 Cell Line	2 バイアル	E8500	761,000
GloResponse™ NFAT-RE- <i>luc2P</i> HEK293 Cell Line	2 バイアル	E8510	761,000
GloResponse™ 9XGAL4UAS- <i>luc2P</i> HEK293 Cell Line	2 バイアル	E8530	761,000
核内受容体融合タンパク質発現			
pBIND-ER Vector	20µg	E1390	68,000
pBIND-GR Vector	20µg	E1581	68,000
pFN26A (BIND) hRluc-neo Flexi [®] Vector	20µg	E1380	68,000
受容体発現			
pF9A CMV hRluc-neo Flexi [®] Vector	20µg	C9361	62,000

全 pGL4 シリーズベクターについては次ページを参照下さい。

ルシフェラーゼ (レポーターベクター)

転写活性 / シグナル伝達

pGL4 Vector 選択ガイド

製品名	マルチ クローニング サイト	レポーター 遺伝子用 プロモーター / 応答配列	レポーター 遺伝子	タンパク質 分析配列	動物細胞 選択 マーカー	サイズ	カタログ 番号	価格 (¥)
ホタルルシフェラーゼ ベクター								
pGL4.10[<i>luc2</i>] Vector	Yes	No	<i>luc2</i>	No	No	20µg	E6651	68,000
pGL4.11[<i>luc2P</i>] Vector	Yes	No	"	hPEST	No	20µg	E6661	68,000
pGL4.12[<i>luc2CP</i>] Vector	Yes	No	"	hCL1-hPEST	No	20µg	E6671	68,000
pGL4.13[<i>luc2/SV40</i>] Vector	No	SV40	"	No	No	20µg	E6681	68,000
pGL4.14[<i>luc2</i> /Hygro] Vector	Yes	No	"	No	Hygro	20µg	E6691	68,000
pGL4.15[<i>luc2P</i> /Hygro] Vector	Yes	No	"	hPEST	Hygro	20µg	E6701	68,000
pGL4.16[<i>luc2CP</i> /Hygro] Vector	Yes	No	"	hCL1-hPEST	Hygro	20µg	E6711	68,000
pGL4.17[<i>luc2</i> /Neo]	Yes	No	"	No	Neo	20µg	E6721	68,000
pGL4.18[<i>luc2P</i> /Neo]	Yes	No	"	hPEST	Neo	20µg	E6731	68,000
pGL4.19[<i>luc2CP</i> /Neo]	Yes	No	"	hCL1-hPEST	Neo	20µg	E6741	68,000
pGL4.20[<i>luc2</i> /Puro]	Yes	No	"	No	Puro	20µg	E6751	68,000
pGL4.21[<i>luc2P</i> /Puro]	Yes	No	"	hPEST	Puro	20µg	E6761	68,000
pGL4.22[<i>luc2CP</i> /Puro]	Yes	No	"	hCL1-hPEST	Puro	20µg	E6771	68,000
pGL4.23[<i>luc2</i> /minP] Vector	Yes	minP	"	No	No	20µg	E8411	68,000
pGL4.24[<i>luc2P</i> /minP] Vector	Yes	minP	"	hPEST	No	20µg	E8421	68,000
pGL4.25[<i>luc2CP</i> /minP] Vector	Yes	minP	"	hCL1-hPEST	No	20µg	E8431	68,000
pGL4.26[<i>luc2</i> /minP/Hygro] Vector	Yes	minP	"	No	Hygro	20µg	E8441	68,000
pGL4.27[<i>luc2P</i> /minP/Hygro] Vector	Yes	minP	"	hPEST	Hygro	20µg	E8451	68,000
pGL4.28[<i>luc2CP</i> /minP/Hygro] Vector	Yes	minP	"	hCL1-hPEST	Hygro	20µg	E8461	68,000
pGL4.29[<i>luc2P</i> /CRE/Hygro] Vector *	No	CRE	"	hPEST	Hygro	20µg	E8471	68,000
pGL4.30[<i>luc2P</i> /NFAT-RE/Hygro] Vector *	No	NFAT-RE	"	hPEST	Hygro	20µg	E8481	68,000
pGL4.31[<i>luc2P</i> /Gal4 UAS/Hygro] Vector	No	GAL4 UAS	"	hPEST	Hygro	20µg	C9351	68,000
pGL4.32[<i>luc2P</i> /NF-κB-RE/Hygro] Vector *	No	NF-κB-RE	"	hPEST	Hygro	20µg	E8491	68,000
pGL4.33[<i>luc2P</i> /SRE/Hygro] Vector	No	SRE	"	hPEST	Hygro	20µg	E1340	68,000
pGL4.34[<i>luc2P</i> /SRF-RE/Hygro] Vector	No	SRF-RE	"	hPEST	Hygro	20µg	E1350	68,000
pGL4.35[<i>luc2P</i> /9XGal4 UAS/Hygro] Vector *	No	9XGAL4 UAS	"	hPEST	Hygro	20µg	E1370	68,000
pGL4.36[<i>luc2P</i> /MMTV/Hygro] Vector	No	MMTV	"	hPEST	Hygro	20µg	E1360	68,000
pGL4.50[<i>luc2</i> /CMV/Hygro] Vector	No	CMV	"	No	Hygro	20µg	E1310	68,000
pGL4.51[<i>luc2</i> /CMV/Neo] Vector	No	CMV	"	No	Neo	20µg	E1320	68,000
ウシシタケルシフェラーゼ ベクター								
pGL4.70[<i>hRluc</i>] Vector	Yes	No	<i>hRluc</i>	No	No	20µg	E6881	68,000
pGL4.71[<i>hRlucP</i>] Vector	Yes	No	"	hPEST	No	20µg	E6891	68,000
pGL4.72[<i>hRlucCP</i>] Vector	Yes	No	"	hCL1-hPEST	No	20µg	E6901	68,000
pGL4.73[<i>hRluc</i> /SV40] Vector	No	SV40	"	No	No	20µg	E6911	68,000
pGL4.74[<i>hRluc</i> /TK] Vector	No	HSV-TK	"	No	No	20µg	E6921	68,000
pGL4.75[<i>hRluc</i> /CMV] Vector	No	CMV	"	No	No	20µg	E6931	68,000
pGL4.76[<i>hRluc</i> /Hygro] Vector	Yes	No	"	No	Hygro	20µg	E6941	68,000
pGL4.77[<i>hRlucP</i> /Hygro] Vector	Yes	No	"	hPEST	Hygro	20µg	E6951	68,000
pGL4.78[<i>hRlucCP</i> /Hygro] Vector	Yes	No	"	hCL1-hPEST	Hygro	20µg	E6961	68,000
pGL4.79[<i>hRluc</i> /Neo]	Yes	No	"	No	Neo	20µg	E6971	68,000
pGL4.80[<i>hRlucP</i> /Neo]	Yes	No	"	hPEST	Neo	20µg	E6981	68,000
pGL4.81[<i>hRlucCP</i> /Neo]	Yes	No	"	hCL1-hPEST	Neo	20µg	E6991	68,000
pGL4.82[<i>hRluc</i> /Puro]	Yes	No	"	No	Puro	20µg	E7501	68,000
pGL4.83[<i>hRlucP</i> /Puro]	Yes	No	"	hPEST	Puro	20µg	E7511	68,000
pGL4.84 [<i>hRlucCP</i> /Puro]	Yes	No	"	hCL1-hPEST	Puro	20µg	E7521	68,000
Hygro = Hygromycin Neo = Neomycin Puro = Puromycin CMV = Cytomegalovirus promoter GAL4UAS = Upstream activating sequence (DNA) to which the GAL4 promoter binds upon galactose activation		HSV-TK = Herpes simplex virus-thymidine kinase promoter SV40 = Simian virus 40 promoter minP = Minimal promoter CL1, hCL1 = Degradation sequence derived from yeast MMTV = Murine Mouse mammary Virus Long Terminal Repeat; MMTV-LTR			PEST, hPEST = Degradation sequence derived from mouse ornithine carboxylase CRE = cAMP response element NFAT-RE = Nuclear factor of activated T cells response element SRE = Serum Response Element SRF-RE = Serum Response Factor Response Element			

※ GL4 Luciferase Reporter Vector の使用は非営利組織 (大学、公的研究機関など)、営利組織にかかわらず、ライセンスプログラムの内容をご確認いただく必要があります。ライセンスプログラムに関しては www.promega.co.jp/license/ をご覧下さい。

* HEK293 細胞に安定に導入した細胞株 "GloResponse™ HEK 293 Cell Line" の価格については 28 ページをご覧ください。

プロメガ資料 : www.promega.co.jp/lit/pgl4.html

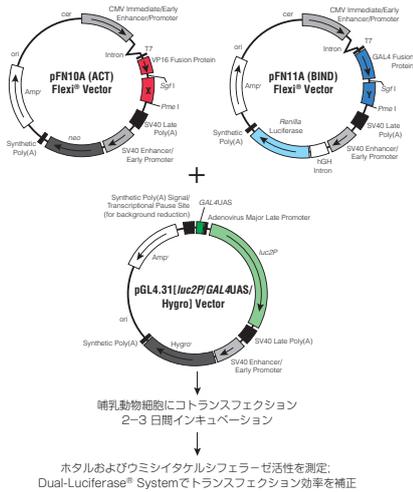
ルシフェラーゼ（レポーターベクター）

ツーハイブリットシステム

CheckMate™/Flexi® Vector Mammalian Two-Hybrid System

哺乳動物細胞内でタンパク質間相互作用を発光検出

2つのタンパク質あるいはドメイン同士（タンパク質XおよびY）の相互作用を哺乳動物細胞を用いたルシフェラーゼアッセイで確認あるいは評価するためのシステムです。目的の哺乳動物タンパク質をコードする遺伝子を製品に含まれるベクターにクローニングし、細胞に導入するとネイティブな細胞内環境でタンパク質の発現および翻訳後修飾が起こります。タンパク質XとYが相互作用すると、VP16 転写活化ドメインとGAL4 DNA結合ドメインによりホタルルシフェラーゼ遺伝子が転写されてレポーターとして機能します。



- 哺乳細胞株で相互作用実験（よりネイティブに近い状態）。
- タンパク質コード領域の移し変えが容易なフレキシクローニングシステム採用
- luc2と分解配列による高いS/N比と迅速な応答
- デュアルルシフェラーゼアッセイなど各種ルシフェラーゼ試薬で定量
- トランスフェクション後約2日で結果が得られます（酵母のシステムは3-4日）
- ベクターは薬剤耐性遺伝子を有するので安定なトランスフェクタントを選択可能。

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Luciferase Mammalian Two-Hybrid System			
ベクターセット			
CheckMate™/Flexi® Vector Mammalian Two-Hybrid System	1システム	C9360	117,000

プロメガ資料： www.promega.co.jp/lit/checkmate.html

※ベクター購入における注意点：pGL4.31[luc2P/GAL4UAS/Hygro] Vector の使用は非営利組織（大学、公的研究機関など）、営利組織にかかわらず、ライセンスプログラムの内容（www.promega.co.jp/license/）をご確認いただく必要があります。

CheckMate™/Flexi Vector Mammalian Two-Hybrid Systemの原理

pGL4.31[luc2P/GAL4UAS/Hygro] Vectorには minimal TATA box+ ホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に GAL4 結合サイトの5回繰返し配列が位置する。2つの標的タンパク質（XおよびY）遺伝子をクローニングしたコンストラクトから発現した融合タンパク質 GAL4-X および VP16-Y が相互作用すると、ルシフェラーゼの発現が飛躍的に増加する。

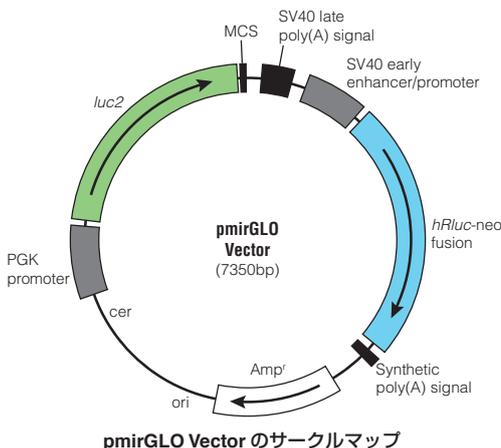
ルシフェラーゼ（レポーターベクター）

RNAi/3'UTR 解析

pmirGLO Vector

RNAiや3'UTR配列の解析に最適なルシフェラーゼレポーターベクター

ホタルルシフェラーゼ遺伝子（luc2）の3'末端側にmiRNA標的サイトを導入し、マイクロRNA（miRNA）活性を定量的に評価するためにデザインされています。ホタルルシフェラーゼは第1のレポーター遺伝子として機能し、ホタルルシフェラーゼ発現の低下は、クローニングしたmiRNA標的配列に対して内在性または細胞内に導入したmiRNAが結合したことを示します。



- miRNA 結合サイトや3' UTRの機能測定
- luc2は最大の発現パフォーマンス
- ウミシイタケ-ネオマイシン耐性カセット（hRluc-neo）は、遺伝子発現の補正用コントロールレポーターおよび安定細胞株の選択用に利用できます。
- 中程度の発現強度を示すヒト-ホスホグリセレートキナーゼ（PGK）プロモーターは非ウイルス性のユニバーサルプロモーターで広範な細胞株で機能（酵母、ラット、マウス、ヒト）

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
miRNA Target Expression Vector			
ベクター			
pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector	20µg	E1330	68,000

プロメガ資料： www.promega.co.jp/lit/pmiringlo.html

※製品購入における注意点：pmirGLO Vector の使用は非営利組織（大学、公的研究機関など）、営利組織にかかわらず、ライセンスプログラムの内容（www.promega.co.jp/license/）をご確認頂く必要があります。

トランスフェクション

FuGENE® 6 & HD

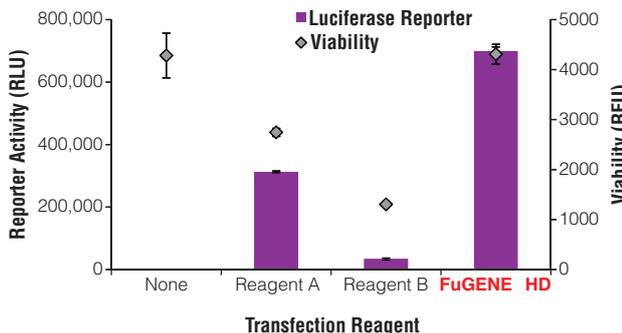
効率と低毒性で選ばれるトランスフェクション試薬



FuGENE® HD Transfection Reagentは、広範な細胞株に対して高効率にDNAをトランスフェクションするためにデザインされた新規な非リポソーム試薬で、毒性も低く抑えられています。プロトコルでは血清や培地を除く必要がなく、試薬/DNA複合体を添加した後に洗浄や培地交換は不要です。表に示された細胞株はプロメガあるいはFugent, L.L.C.でトランスフェクションが確認されたものです。これらの細胞株およびその他のトランスフェクション条件は”FuGENE® HD プロトコルデータベース”よりご覧いただけます。

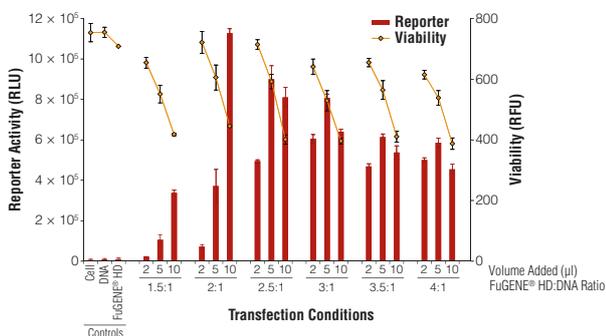
FuGENE® 6 Transfection Reagentは、非リポソームタイプのトランスフェクション試薬で、高い効率で細胞にDNAを導入することができ、細胞毒性も低く抑えられています。プロトコルには血清や培地の除去ステップがなく、試薬/DNA複合体を導入した後に洗浄や培地交換を必要としません。

- ・細胞にやさしい試薬：低毒性で細胞機能への影響も最低限。
- ・シンプルなプロトコル：培地交換不要でばらつきも低減され、血清にも適応
- ・多くの細胞タイプに効果的：初代培養細胞、幹細胞を含む40種類の細胞タイプの情報を収めたオンラインデータベースをご用意（FuGENE® HD）
- ・ルシフェラーゼアッセイにも最適：より効率的な発現と高感度なデータが得られます。



他社試薬とのタンパク質発現および生存性の比較

FuGENE® HDは他社競合品に比べ高いトランスフェクション効率と生存性を示した。



HEK-293を用いたトランスフェクション条件最適化実験

HEK-293細胞を85%のコンフルエンスになるまで培養し、採取した後に96ウェルプレートに1ウェルあたり2 × 10⁴個/100μlで播種した。翌日、構成的SV40プロモーター制御下でホタルルシフェラーゼを発現するpGL4.13 Vector (カタログ番号E6681)をFuGENE® HD Reagentで表示の試薬：DNA比で混和し、15分間インキュベーションした後ウェルあたり2μl, 5μlまたは10μl添加した。24時間後、細胞生存性 (CellTiter-Fluor™ Viability Assay) およびレポーター活性 (ONE-Glo™ Luciferase Assay System) についてGloMax®-Multi Detection Systemを用いて測定した。データはリプリケートサンプルの平均±SEM

FuGENE HDで成功した細胞株例

NIH3T3	U-937
HEK293	STSAR90
CHO-K1	AGS
CHO-S	BHK-21
SNU-16	Caco-2
A-375	Caki-1
T98G	Capan-1
HeLa	H4
HepG2	Human skeletal muscle myoblasts (HSMM)
High Five™	NCI-N87
MCF7	Panc-1
mES	SKMEL-28
hES	SK-OV-3
PC3	T-24
RAW 264.7	T-84
SCC61	U-87 MG
SQ20B	A549
STO	DMS 53
U-2 OS	T47D
COS-7	Jurkat
293F	Huh7

上記以外の例については以下のサイトをご覧ください。

FuGENE HD プロトコルデータベース

www.promega.com/techserv/tools/FugeneHdTool/

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
Transfection Reagent トランスフェクション試薬			
FuGENE® HD Transfection Reagent	1ml	E2311	59,000
	5 × 1ml	E2312	234,000
FuGENE® 6 Transfection Reagent	1ml	E2691	59,000
	5 × 1ml	E2692	234,000

プロメガ資料：

FuGENE HD: www.promega.co.jp/it/fugenehd.html

FuGENE 6: www.promega.co.jp/it/fugene6.html

FuGENE is a registered trademark of Fugent, L.L.C. USA

See terms of use at www.promega.com/lull.

カスタムアッセイサービスプログラム (CAS)

創薬研究への提案

プロメガが所有する革新的な技術を駆使し、お客様の要望に応じた生物学的に相関性のある測定法を共同で研究・開発させていただきます。

- より迅速なデータ収集を提案
- お客様のマンパワーを最小限に抑え、最大限の生産性を提案
- お客様のニーズに即した柔軟性のある対応



カスタムアッセイサービス事業

プロメガは生化学的及び細胞を用いたアッセイ法をご提供する為に、必要となる様々な技術、専門性の高い研究員、最先端の設備を完備しています。

- 細胞工学：正常な状態、病態モデルをターゲットした細胞の樹立
- 測定法の開発及び検定作業：専門的な分類技術と測定法の組み合わせ技術
- 測定に対応した細胞の調製：薬理的確認やその他要望に即した対応

さらに、これらの測定法、細胞をご提供後も、測定に関してのサポートをお約束いたします。

詳細については弊社までお問い合わせ下さい。

関連製品

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
アポトーシス / 細胞増殖 / 毒性試験			
細胞毒性試験 (死プロテアーゼ：蛍光)			
CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay	10ml	G9260	16,000
	5 × 10ml	G9261	65,000
細菌数測定 (ATP：発光)			
BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay	10ml	G8230	14,000
	10 × 10ml	G8231	65,000
カスパーゼ阻害剤			
Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK	50µl	G7231	37,000
	125µl	G7232	63,000
Caspase Inhibitor Ac-DEVD-CHO	100µl	G5961	27,000
レポーターアッセイ			
クリックビートルルシフェラーゼ測定試薬			
Chroma-Glo™ Luciferase Assay System	10ml	E4910	29,000
	100ml	E4920	234,000
クリックビートルルシフェラーゼベクター			
pCBB-Basic Vector	20µg	E1411	53,000
pCBB-Control Vector	20µg	E1421	53,000
pCBG68-Basic Vector	20µg	E1431	53,000
pCBG68-Control Vector	20µg	E1441	53,000
pCBG99-Basic Vector	20µg	E1451	53,000
pCBG99-Control Vector	20µg	E1461	53,000
ホタルルシフェラーゼ抗体			
Anti-Luciferase pAb	200µg	G7451	31,000
β - ガラクトシダーゼ測定試薬 & ベクター			
Beta-Glo Assay System	10ml	E4720	15,000
Beta-Glo Assay System	100ml	E4740	109,000
Beta-Glo Assay System	10 × 100ml	E4780	679,000
pSV-β-Galactosidase Control Vector	20µg	E1081	18,000

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
レポーターアッセイ (続き)			
細胞選択用抗生物質			
Antibiotic G-418 Sulfate	5g	V7983	64,000
Antibiotic G-418 Sulfate Solution	20ml	V8091	18,000
ヒト-タンパク質発現クローン			
Flexi® HaloTag Clone	1クローン	FHCXXXX	50,000 ~
7000以上のヒト-クローン (HaloTag® 融合) を収蔵。 詳細については www.promega.co.jp/flexiclone/			
プラスミド精製 (トランスフェクショングレード)			
PureYield™ Plasmid Miniprep System	100回分	A1223	23,000
PureYield™ Plasmid Midiprep System	25回分	A2492	29,000
PureYield™ Plasmid Maxiprep System	10回分	A2392	27,000
ルミノメーター			
シングルチューブフォーマット			
GloMax™ 20/20n Luminometer (本体)	1セット	E5311	1,200,000
GloMax™ 20/20n Luminometer with Dual Injectors (本体 + インジェクター 2本)	1セット	E5331	1,900,000
96 ウェルプレートフォーマット			
GloMax® 96 Microplate Luminometer (本体)	1セット	E6501	2,650,000
GloMax® 96 Microplate Luminometer with Dual Injectors (本体 + インジェクター 2本)	1セット	E6521	3,650,000
マルチプレートフォーマット			
GloMax®-Multi+ Luminescence System with Instinct Software with Shaking (ルミノメーター + シェーカー)	1セット	E8032L	2,780,000
GloMax®-Multi+ Luminescence System with Instinct Software with Shaking, Heating and Dual Injector (ルミノメーター + シェーカー + ヒーター + デュアルインジェクター)	1セット	E9032LD	3,680,000

日本語 Web site : www.promega.co.jp

テクニカルサービス • Tel. 03-3669-7980 / Fax. 03-3669-7982 • E-Mail : prometec@jp.promega.com

プロメガ株式会社

本社 〒103-0011
東京都中央区日本橋大伝馬町14-15 マツモトビル
Tel. 03-3669-7981 / Fax. 03-3669-7982

大阪事務所 〒532-0011
大阪市淀川区西中島6-8-8 花原第8ビル704号室
Tel. 06-6390-7051 / Fax. 06-6390-7052

※製品の仕様、価格については2014年 9月現在のものであり予告なしに変更することがあります。

販売店：