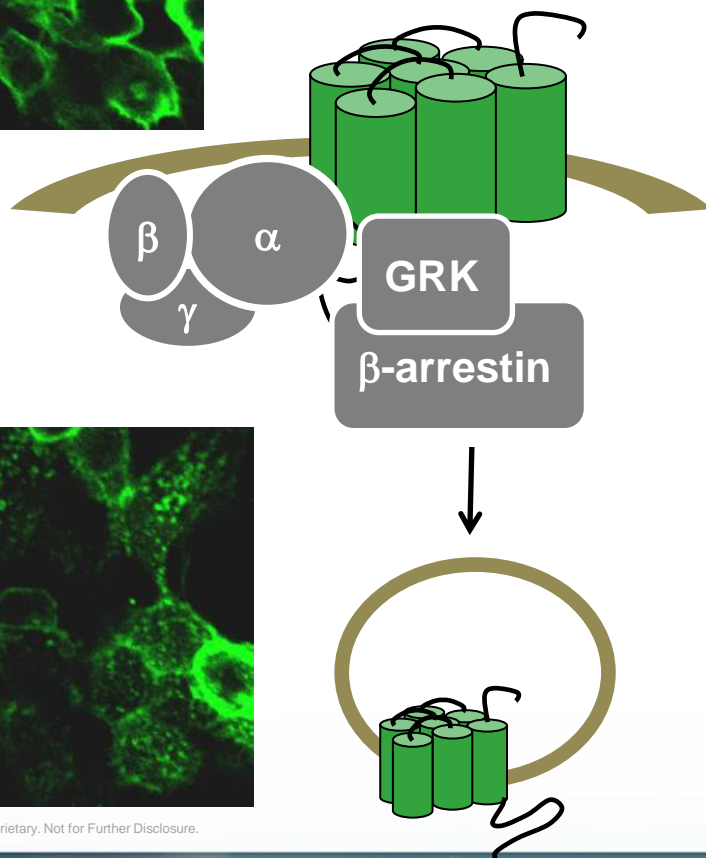
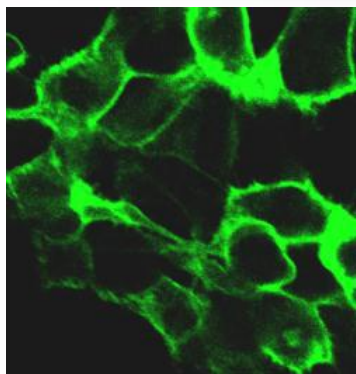


エンドサイトーシスの解析法は イメージングだけではありません！



エンドサイトーシスを解析したい
でも…

顕微鏡がない／なかなか使えない
サンプル数が多い

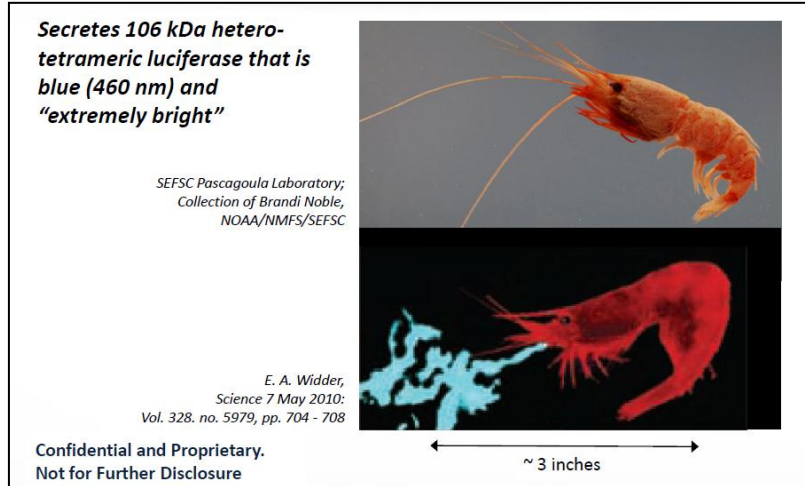
画像解析ではなく定量化したい

そんな悩みをお持ちの方、**NanoLuc**を
試してみませんか？

NanoLucは「小さい」「明るい」
新規ルシフェラーゼ

NanoLucを使えば
ルミノメーターで簡単に
エンドサイトーシスを定量化できます

NanoLucとは？

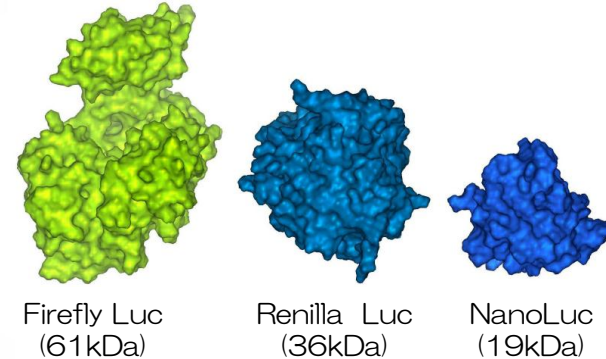


NanoLucとは

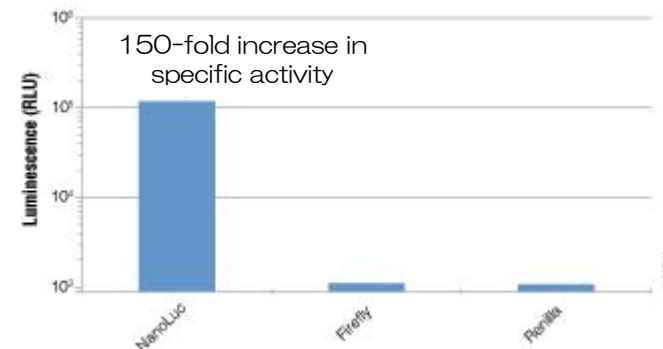
- 深海エビ由来のルシフェラーゼをプロメガが大幅に改良したもの
- 右の特徴を持つ
- 詳細はウェブで！

<http://www.promega.com/products/pm/nanoluc/>

- 小さい: 19kDa



- 明るい: ホタル、レニラの100倍以上



- 多才: レポーターアッセイ、局在解析、タンパク質分解、タンパク質相互作用

NanoLucエンドサイトーシスアッセイ原理

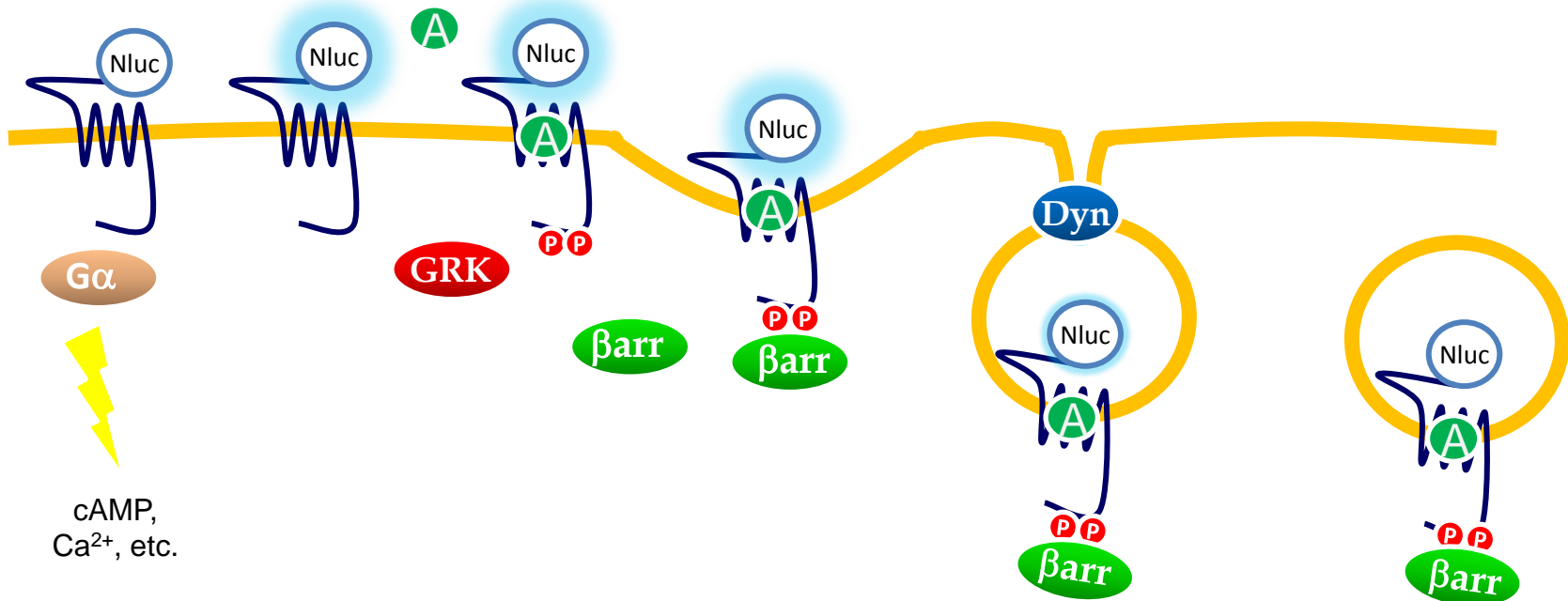
Nluc-POI

Nluc substrate

Desensitization

Endocytosis

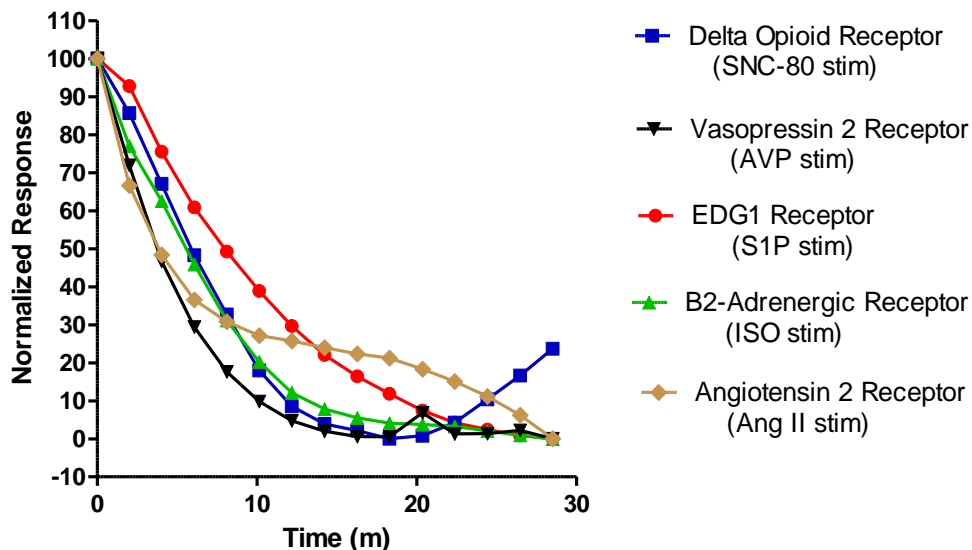
Nluc quench



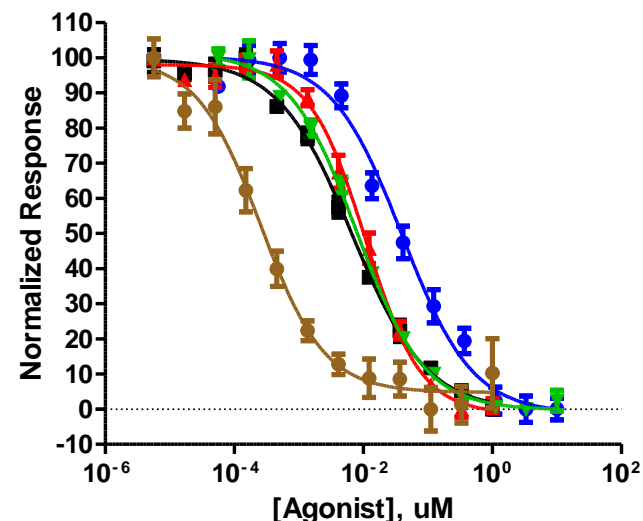
- 最小限のコンストラクションで実験可能
GPCRのN末端にIL6シグナルペプチド+ NanoLucを付加するだけ！
- ルミノメーターで簡単に測定可能
- 細胞生存性・毒性アッセイなどとマルチプレックス可能

エンドサイトーシス測定事例

NanoLuc-GPCR Endocytosis
Timecourses at max dose of agonist



NanoLuc-GPCR Endocytosis
Dose-Responses at 30 Minutes



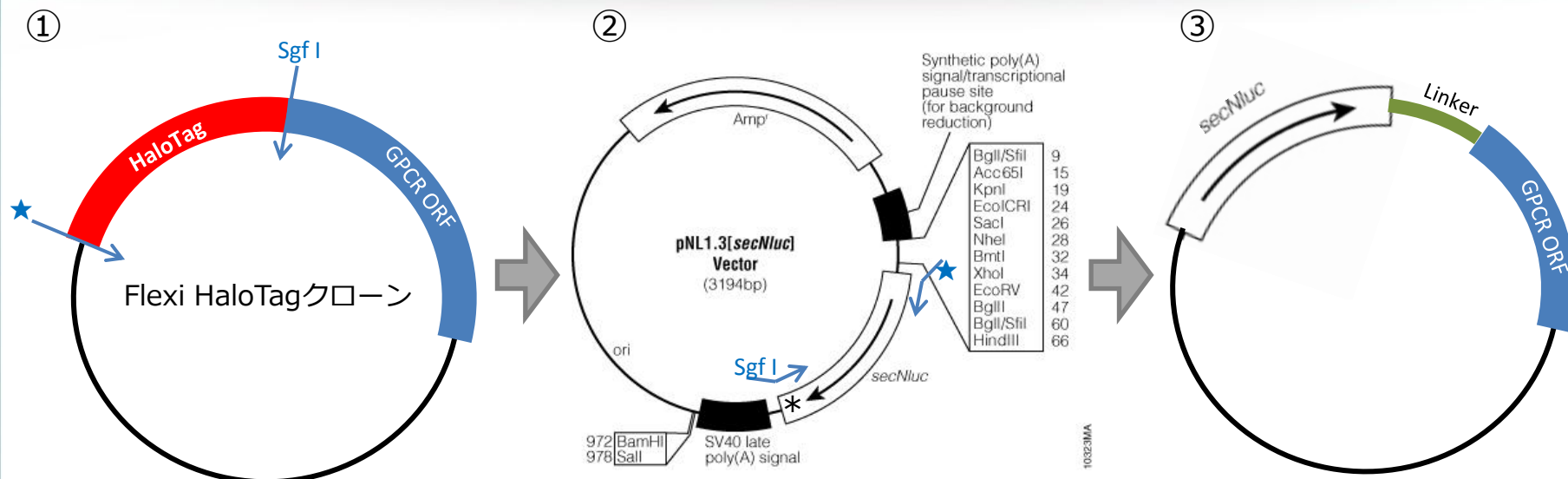
各種GPCRのエンドサイトーシス

左：各IL6-Nluc-GPCRコンストラクトをHEK293細胞に一過性に導入。無血清培地で4時間インキュベート。Nano-Glo Substrate* 20 μ Mを培地に添加して5分後に、各アゴニストで刺激し、ルミノメーターで経時的に発光測定した。すべてのステップは37°Cで行った。データはt=0に対する相対値を%で表示。

*Nano-Glo (カタログ番号N1110)の構成品

右：各アゴニストの容量反応性を調べた。左の実験と同様に細胞を調製、アゴニスト刺激後30分で発光測定し、未処理コントロールに対する相対値を%で表示。

IL6SP-Nluc-GPCRコンストラクトの作り方



① GPCR Flexi HaloTagクローンを準備。HaloTag上流で1cutできるサイト(★)を確認。

② pNL1.3 (カタログ番号N1021)のsecNlucをPCRで増幅

Forwardプライマー： HaloTag上流サイト(★)を付加

Reverseプライマー： Sgf Iとリンカーを付加、ストップコドンをつぶす

※secNluc配列はストップコドン以外変えないで下さい。ライセンスに抵触します。

③ GPCR Flexi HaloTagクローンのHaloTagとsecNluc+リンカー*を入れ替え

*適当なリンカー配列を挿入すると解析時に失敗しにくい。プロメガでは下記リンカー配列を使用。

塩基配列： 5'- GAG CCA ACC ACT GAG GAT CTG TAC TTT CAG AGC GAT AAC GCG -3'

ハプロト配列： EPTTEDLYFQSDNA (赤はTEV切断サイト)

GPCR配列を挿入するだけのベクターもカスタム品で販売！詳細はお問合せ下さい。