

Promega Notes 96 アブストラクト

生物発光の利点

科学者は異なる実験目的ごとに様々な発光反応（光子放出）を利用していますが、生物発光が次第に多くの分析タイプで優先的に選ばれるようになってきました。本稿では、生物学的分析法に生物発光を導入する利点とその理由について概説します。

[本誌3ページ参照] Full Text → http://www.promega.com/pnotes/96/15080_03/15080_03.pdf

pGL4 Vector の命名法則

pGL4 Vectorは最も進歩したルシフェラーゼレポーターベクターで、最大の発現、変則的な発現などのオフターゲットな応答の低減、転写ダイナミクスに対する迅速な応答が得られます。pGL4 Vectorにはホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼを発現する2種類が存在します。pGL4は、ルシフェラーゼレポーター遺伝子、プロモーターや応答配列を含む上流エレメントおよび選択マーカーの3つの中心となる部位の様々な組合せからなる選択支（ベクター種）を数多く揃えています。pGL4 Vectorはこれらの特徴を反映した法則に基づいて命名されています。

Full Text → http://www.promega.com/pnotes/96/15080_06/15080_06.pdf

転写調節エレメントと遺伝子ネットワークのスクリーニングのための新しいハイスループットテクノロジー

本稿では生細胞における調節パスウェイの詳細な分析を可能にする新しいツールセットの開発について記述します。SwitchGear Genomics社では、最先端のルシフェラーゼレポーターベクターpGL4.11 [luc2P] Vectorに数千のヒト・プロモーター、UTRおよびその他の調節エレメントを組み込んだライブラリーを製作しています。このライブラリーは、広いダイナミックレンジを持つデータを非常に再現性良く収集できる能力と、1つの実験で数百から数千のプロモーター解析へとスケールアップできる能力を併せ持っています。

Full Text → http://www.promega.com/pnotes/96/15080_08/15080_08.pdf

Pgp-Glo™ Assay Systemを用いた迅速なHTSによるP-糖タンパク質基質および阻害剤の同定

Pgp-Glo™ Assay Systemは、発光法によるP-糖タンパク質 (Pgp) ATPaseをアッセイするシステムです。Pgp-Glo™ Assayは、細胞膜画分内の組織換えヒトPgpに対する化合物の影響を検出します。アッセイの原理は、ホタルルシフェラーゼ発光反応のATP依存性を利用してPgpのATPase活性を検出するというものです。PgpによるATP消費速度は、ルシフェラーゼ反応による発光シグナルと負の相関関係を示します。Pgp-Glo™ Assayは、ハイスループットスクリーニングに応用しやすく、セルベースのPgp研究を補完することができます。

[本誌16ページ参照] Full Text → http://www.promega.com/pnotes/96/15080_11/15080_11.pdf

p450-Glo™ CYP3A4を用いた生化学解析およびセルベースアッセイ

多くの治療薬の生物学的効能やクリアランスは、まずシトクロムP450酵素により媒介されます。一方で、P450の活性変化により薬物間相互作用が頻繁に起こる事が知られています。本稿では、薬物探索の初期段階でP450の誘導あるいは阻害が基となる薬物間相互作用を予測できるシトクロムP450アッセイをご紹介します。ここでは、CYP3A4酵素のアッセイに焦点を当てています。このCYP3A4酵素はヒトの肝臓にあるP450のうち約30%を占めており、初期代謝の後に排除される全ての薬物の約半数を酸化します。今回我々は3種の発光性のCYP3A4基質：Luciferin-BE、Luciferin-PFBE、Luciferin-PPXEを開発しました。これらの基質は、リコンビナントCYP3A4を用いたin vitroでの生化学解析で被験化合物によるP450阻害を検出するためのプローブとして使用されています。さらに、Luciferin-PFBEは、薬物によるCYP3A4遺伝子誘導のセルベース測定に有効です。セルベースアッセイは迅速かつ簡易的であり、細胞非溶解法が実施できるため、次の解析に使用できるインタクトな細胞状態を保つことができます。

[本誌20ページ参照] Full Text → http://www.promega.com/pnotes/96/15080_15/15080_15.pdf

プロメガのGloMax™ Luminometerおよび生物発光アッセイを用いた生物学的および細胞内の活性測定

プロメガの発光アッセイシステム開発はホタルルシフェラーゼレポーターアッセイから始まり、生化学的あるいは細胞内活性（細胞生存性・毒性、アポトーシス活性、キナーゼ活性など）を測定するための様々なアッセイシステムを開発してきた長い歴史があります。GloMax™ Integrated Luminescence Systemは試薬、測定機器、ソフトウェア、プロトコルを1つに集約したサポートシステムです。GloMax™ Luminometerの有する高い感度と広いダイナミックレンジは最適な生物発光シグナルを測定する優れたツールとなります。

[本誌13ページ参照] Full Text → http://www.promega.com/pnotes/96/15080_19/15080_19.pdf

より短時間でタンパク質を発現：KRXの短時間誘導プロトコル

Single Step (KRX) Competent Cellsは、組織換えタンパク質発現のための新しいクローンを迅速に作製する上で理想的な大腸菌です。我々は、KRXを用いて組織換えタンパク質の収量と活性に対する誘導時間および培地の影響について調べました。実験では、ホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼをモデルとして使用しました。4時間というわずかな誘導時間でも活性を持つタンパク質を十分量生成させることができました。Single Step (KRX) Competent Cellsでこの短時間誘導プロトコルを用いることにより、一昼夜の誘導を必要とせずに短時間でタンパク質を発現させ、分析することができます。

Full Text → http://www.promega.com/pnotes/96/15080_20/15080_20.pdf

MagneGST™ Pull-Down Systemに対するSingle Step (KRX) Competent Cellsの適応性

本研究は、MagneGST™ Pull-Down Systemを用いたタンパク質間相互作用の研究におけるSingle Step (KRX) Competent Cellsの適用性について検証しました。KRXで発現させたGST融合Bait（餌）タンパク質をMagneGST™ グルタチオンリンク磁性体粒子上に捕捉し、TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation Systemを用いてin vitroで発現させたPrey（餌食）とともにインキュベーションしました。捕捉した餌食タンパク質はHaloTag® Interchangeable Labeling Technologyを用いて検出しました。

Full Text → http://www.promega.com/pnotes/96/15080_22/15080_22.pdf

大腸菌株KRXを用いたセレノメチオニンによるタンパク質標識

我々は、Monster Green® 蛍光タンパク質をモデルとして、大腸菌株KRXでGFPを発現させる際にセレノメチオニン (Se-Met) の組み込み効率を平均90%以上にすることができました。そのため、Single Step (KRX) Competent Cellsを用いて、X線結晶学的技法などの構造生物学のアプリケーションのためのSe-Met標識タンパク質サンプルを調製することができます。

Full Text → http://www.promega.com/pnotes/96/15080_24/15080_24.pdf