

# Cell Tox Guide

細胞死メカニズムからスクリーニングまで



Contents :

• <b>イントロダクション</b>	2
• 細胞毒性	4
• ミトコンドリア毒性	9
• アポトーシス&細胞死メカニズム	10
• グルタチオンアッセイ	12
• P450アッセイ	13
• ADCCアッセイ	14
• レポーターによるストレスアッセイ	15
• マルチプレートリーダー	16



## 細胞毒性と医薬品開発

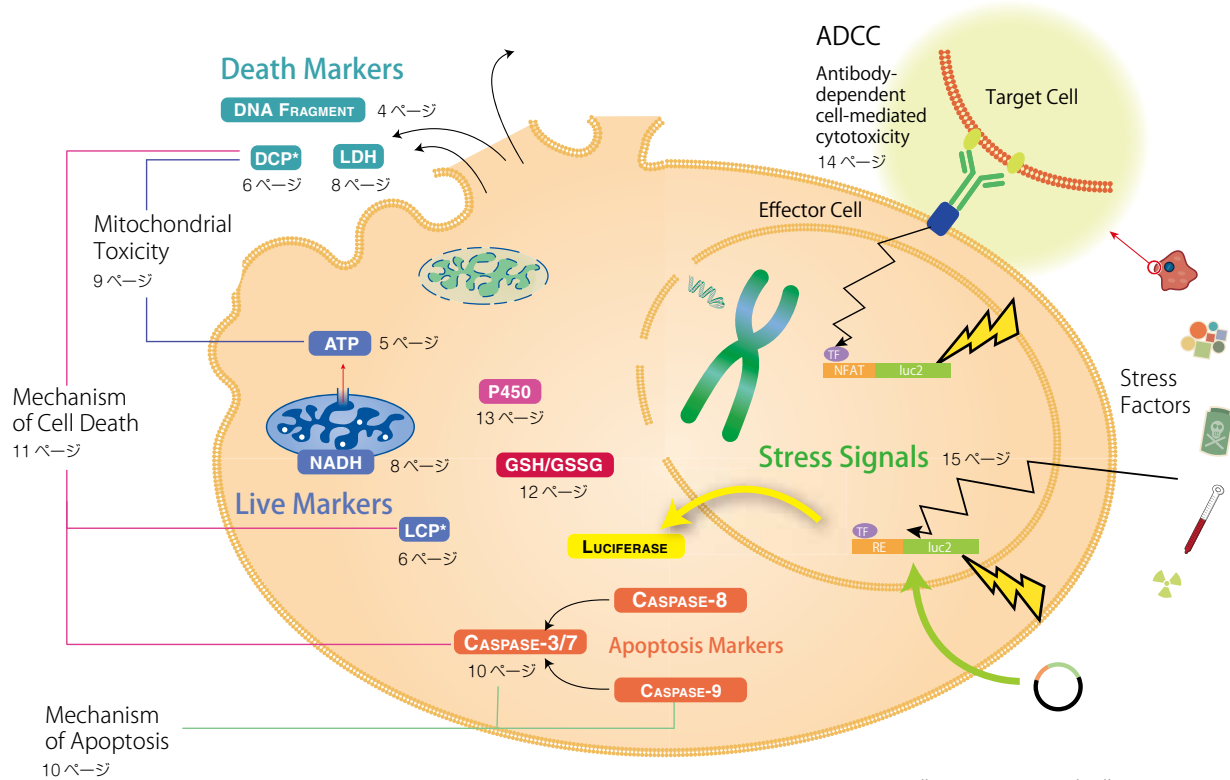
培養細胞を用いた増殖試験や毒性試験は、ドラッグスクリーニングや各種物質の毒性分析に不可欠であり、動物個体を用いた実験手法に比べて処理能力や操作性に優れます。近年は、iPS細胞を代表する多能性幹細胞の研究分野の発展により、疾患モデルとしての患者由来の培養細胞を毒性試験のスクリーニングに用いることが可能になりつつあります。このような貴重な細胞を実験材料として用いる際、少量の細胞から高感度で精度の高い試験データを得ることが、実験上必要となってきます。プロメガでは、ルシフェラーゼによる生物発光を中心とした高感度で簡便なアッセイ試薬を開発すると同時に、一度のアッセイでより多くの情報が得られる様々なアッセイシステムを開発しており、希少サンプルを用いたスクリーニングに適しています。

また、近年その応用が期待されている抗体医薬は、正常な細胞まで破壊する従来の抗癌剤等とは違い、副作用の少ない効果的な治療薬として注目されています。この抗体医薬の作用機序の一つADCC（Antibody-Dependent-Cell-mediated-Cytotoxicity：抗体依存性細胞傷害）活性は抗体医薬の質を測るうえで重要なファクターであり、抗体医薬を開発する上で重要なデータとなります。プロメガでは従来のADCCアッセイを改良し、レポーターを用いた生物発光を利用したアッセイシステムADCC Reporter Bioassay Kitを開発することに成功しました。これにより、従来法に比べ、より高感度かつ短時間で治療用抗体の活性を定量化することが可能になります。

## 細胞毒性マーカー(ATP, LDH, Protease, DNA)と毒性シグナル経路について

細胞毒性を図る古典的な方法としてこれまで<sup>51</sup>Cr放出アッセイやトリパンブルー染色などの方法がとられてきましたが、それぞれRI取扱いの問題や多検体処理が困難であることなどから現在では細胞内マーカーを測定する方法が広く用いられています。細胞内マーカーには細胞傷害により漏出したマーカーを検出し、細胞死を直接的に測定する方法や、細胞内の代謝機能を測定し、その減少をとらえて細胞毒性を見積もる方法があります。現在最も利用されている細胞漏出マーカーとして乳酸脱水素酵素(LDH)、細胞代謝活性の指標としてはNADHなどによる還元能を測定する方法などが挙げられます。プロメガでは新規細胞内マーカーの発見や新しい基質、色素を採用した数多くのアッセイキットを販売しており、用途に合わせ選択して頂けます。

## 細胞毒性関連マップ



## イントロダクション

## 細胞毒性関連製品選択ガイド

製品名	マーカー	検出	検出までの時間	感度	マルチアッセイ	ページ
<b>細胞毒性試験</b>						
死細胞	CellTox™ Green Cytotoxicity Assay	<b>NEW</b> DNA	蛍光 (Ex <sub>513</sub> /Em <sub>532</sub> )	0分間 -72時間*	細胞 200個	◎ 4
	CytoTox-Glo™ Assay	DCP	蛍光	15分間	細胞 10個	○ 7
	CytoTox-Fluor™ Assay		蛍光 (Ex <sub>485</sub> /Em <sub>520</sub> )	30分間 -3時間	細胞 10個	○ 7
	CytoTox-ONE™ Assay	LDH	蛍光 (Ex <sub>560</sub> /Em <sub>590</sub> )	10分間	細胞 200個	○ 8
	CytoTox 96® Cytotoxicity Assay		発色 (490nm)	30分間	細胞 1000個	— 8
生細胞	CellTiter-Glo® Assay	ATP (エネルギー合成能)	発光	10分間	細胞 10個*	○ 5
	CellTiter-Fluor™ Assay	LCP	蛍光 (Ex <sub>400</sub> /Em <sub>505</sub> )	30分間 -3時間	細胞 40個	◎ 7
	CellTiter-Blue® Assay	還元能 (NADH など)	蛍光 (Ex <sub>560</sub> /Em <sub>590</sub> ) または発色 (570nm)	1-4時間	細胞 50個*	○ 8
	CellTiter 96® Aqueous One Solution Assay		発色 (490nm)	1-4時間	細胞 800個	— 8
アポトーシス細胞	Caspase-Glo® Assay	Caspase-3/7, 8, 9	発光	30分間 -2時間	細胞 20個 (3/7)*	○ 10
	Apo-ONE® Caspase-3/7 Assay	Caspase-3/7	蛍光 (Ex <sub>499</sub> /Em <sub>521</sub> )	1-18時間	細胞 200個*	○ 11
酸化ストレス細胞	GSH/GSSG-Glo™ Assay	総グルタチオン /GSSG	発光	1時間	細胞 300個*	○ 12
	GSH-Glo™ Glutathione Assay	還元型グルタチオン	発光	1時間	細胞 300個*	○ 12

## 細胞死メカニズム (マルチアッセイ)

アポトーシス細胞 / 生細胞 / 死細胞	ApoTox-Glo™ Triplex Assay	LCP / DCP / カスパーゼ	蛍光 (Ex <sub>400</sub> /Em <sub>505</sub> ) / (Ex <sub>485</sub> /Em <sub>520</sub> ) / 発光	1時間	生細胞 40個 / 死細胞 10 / アポトーシス細胞 20個	— 11
アポトーシス細胞 / 生細胞	ApoLive-Glo™ Multiplex Assay	LCP / カスパーゼ	蛍光 (Ex <sub>400</sub> /Em <sub>505</sub> ) / 発光	30分間	生細胞 40個 / アポトーシス細胞 20個	○ 11
生細胞 / 死細胞	MultiTox-Fluor Assay	LCP / DCP	蛍光 (Ex <sub>400</sub> /Em <sub>505</sub> ) / (Ex <sub>485</sub> /Em <sub>520</sub> )	30分間 -3時間	生細胞 40個 / 死細胞 10個	○ 7
	MultiTox-Glo Assay	LCP / DCP	蛍光 (Ex <sub>400</sub> /Em <sub>505</sub> ) / 発光	30分間	生細胞 40個 / 死細胞 10個	○ 7
ミトコンドリア毒性 (死細胞 / ミトコンドリア活性)	Mitochondrial ToxGlo™ Assay	<b>NEW</b> DCP/ATP	蛍光 (Ex <sub>485</sub> /Em <sub>520</sub> ) / 発光	30分間	—	○ 9

\*0ステップアッセイなら常に測定でき、最大72時間細胞毒性を観察可能 \*384ウェルプレート LCP: Live Cell Protease, DCP: Dead Cell Protease

製品名	マーカー	検出	検出までの時間	感度	マルチアッセイ	ページ
<b>P450 活性</b>						
薬物代謝	P450-Glo™ Assay	CYP1A2, 3A4, 1A1, 2C9, 4A	発光	1-6時間	高	○ 13

製品名	検出	感度	ページ
<b>ADCC</b>			
抗体医薬のエフェクター機能	ADCC Reporter Bioassay Kit	<b>NEW</b> 発光 (T細胞核内転写因子 [NFAT] 応答配列によるレポーターアッセイ)	高 14

製品名	応答配列	検出	感度	ページ
<b>ストレス応答</b> <b>NEW</b>				
酸化ストレス	pGL4.37[luc2P/ARE/Hygro] Vector	抗酸化剤応答配列 (ARE)	高 15	各種応答配列を含むルシフェラーゼレポーターベクターを細胞内に導入し、ルシフェラーゼ活性を測定 ・ONE-Glo™によるストレス応答測定 ・ONE-Glo™ + Tox Luciferase Reporter and Cell Viability Assayによる細胞数測定法とのマルチプレックスも可能
DNA 損傷	pGL4.38[luc2P/p53 RE/Hygro] Vector	p53 応答配列 (p53 RE)		
小胞体ストレス	pGL4.39[luc2P/ATF6 RE/Hygro] Vector	活性化転写因子 6 応答配列 (ATF6 RE)		
重金属ストレス	pGL4.40[luc2P/MRE/Hygro] Vector	金属応答配列 (MRE)		
熱ショック	pGL4.41[luc2P/HSE/Hygro] Vector	熱ショック配列 (HSE)		
低酸素ストレス	pGL4.42[luc2P/HRE/Hygro] Vector	低酸素応答配列 (HRE)		
生体異物ストレス	pGL4.43[luc2P/XRE/Hygro] Vector	生体異物応答配列 (XRE)		
MAPK/JNK	pGL4.44[luc2P/AP1 RE/Hygro] Vector	AP1 応答配列 (AP1 RE)		

## 細胞毒性試験の最先端検出テクノロジー

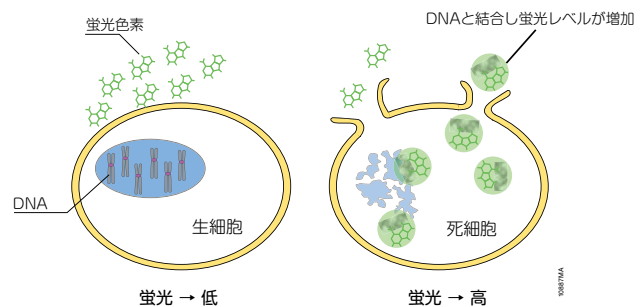
新しい DNA マーカーと ATP マーカー測定技術

### CellTox™ Green Cytotoxicity Assay (蛍光: 細胞毒性) **NEW**

最も簡便な細胞毒性試験。長時間の経時変化も追跡可能!

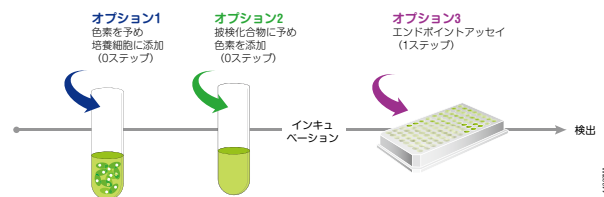
細胞毒性を検出する際、細胞死のマーカーの選択が重要となります。従来の細胞毒性試験においては、LDHや死細胞由来のプロテアーゼなどの酵素活性をマーカーとしてきました。これら酵素ベースの細胞毒性キットの問題点として、細胞死マーカーとしての酵素が長時間にわたる培養により分解してしまうという点がありました。プロメガではこの問題点を克服するため、細胞膜非透過性の新規なDNA結合型蛍光色素を利用したアッセイキットCellTox™ Green Cytotoxicity Assayを開発しました。CellTox™ Green Cytotoxicity Assayは細胞膜非透過性のDNA結合型蛍光色素CellTox™ Green Dyeを用いて、生細胞から排出され、死細胞由来のDNAに選択的に結合し、細胞膜障害性を検出します。CellTox™ Green Dyeは細胞に対して毒性を示さず、薬剤暴露後72時間後でも安定したシグナルを維持するため、経時的測定あるいは長時間の薬剤暴露後のエンドポイント測定による毒性評価に最適です。

- ・ **簡便:** 0ステップ(細胞接種前あるいは薬剤含有培地に Dye を直接加える)で、試薬の分注ステップを省略できる。
- ・ **低毒性:** 薬剤暴露後 0-72 時間の長時間の経時的測定が可能。
- ・ **マルチアッセイ:** 細胞生存性試験、アポトーシス試験などのマルチアッセイが可能。
- ・ **様々なサンプル種に対応:** 接着細胞、浮遊細胞、3D 培養、バクテリアなど



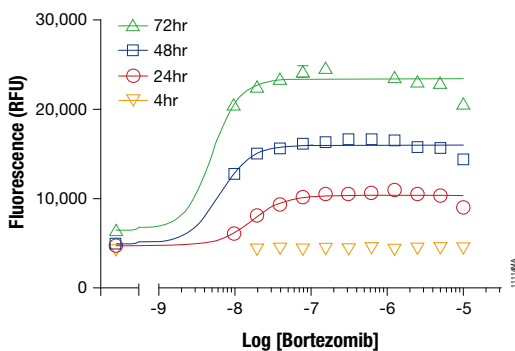
#### CellTox™ Green の測定原理

細胞非透過性の蛍光色素が死細胞から漏出した DNA に結合し蛍光強度が増加



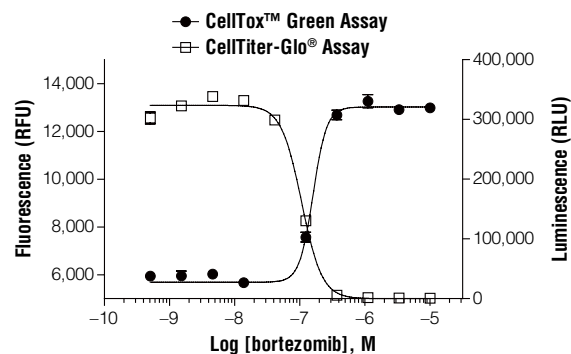
#### 3つのプロトコルから選べます!

予め培養細胞や化合物に試薬を溶解させる 0ステップアッセイで経時的に観察が可能。最後に試薬を加える 1ステップのエンドポイントアッセイ。



#### CellTox™ Green による経時的な分析

K562 細胞のボルテゾミブ処理 4 ~ 72 時間後の細胞毒性



#### マルチアッセイによる細胞健全性の相補的な測定

K562 細胞をボルテゾミブ処理 48 時間後に CellTox™ Green Reagent (細胞毒性)、CellTiter-Glo® Reagent (細胞生存性) で測定した。どちらも同様の EC<sub>50</sub> 値を示した。

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
<b>細胞毒性試験 (蛍光・DNA)</b>			
<b>アッセイシステム</b>			
CellTox™ Green Cytotoxicity Assay	10ml	G8741	14,000
	50ml	G8742	55,000
	100ml	G8743	80,000
CellTox™ Green Express Cytotoxicity Assay (Dye)	200µl	G8731	75,000

・ 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。

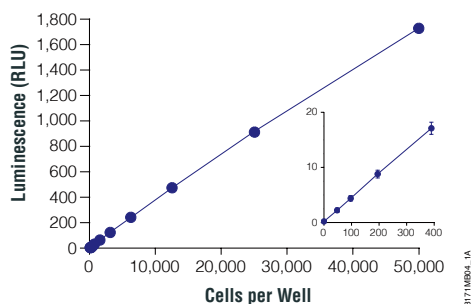
## 細胞毒性試験 (先進技術)

## CellTiter-Glo® Assay (発光: 細胞生存性)

## 超高感度な細胞内ATPをベースとした細胞生存試験

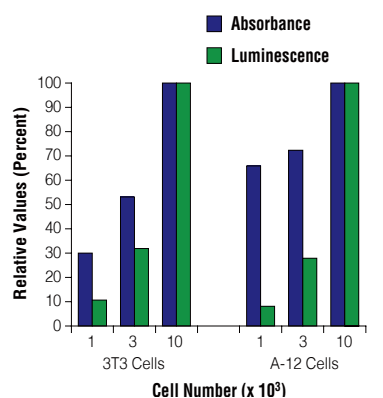
細胞生存性の定量化においても、安定性の高い、より高精度なマーカーの選択が重要となります。ATP (アデノシン三リン酸) は代謝活性のある全ての細胞に存在し、その濃度は細胞がネクロシスあるいはアポトーシスを起こしたときに急速に減少するため、ATPは細胞障害、細胞増殖抑制あるいは細胞増殖効果の優れたマーカーとなります。プロメガのCellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assayは、代謝活性のある細胞に由来するATPを定量することで培養中の生存細胞数を測定する細胞増殖・毒性システムです。マルチプレートのアッセイ用にデザインされており、自動化されたハイスルー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・三次元培養細胞を用いる場合に威力を発揮します。

- ・ **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



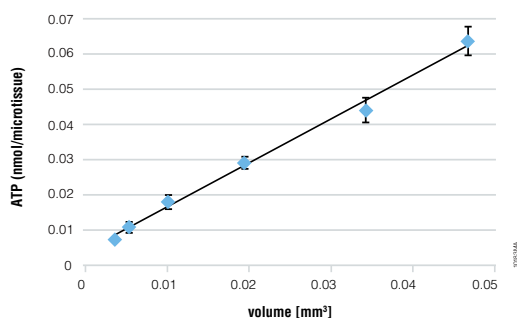
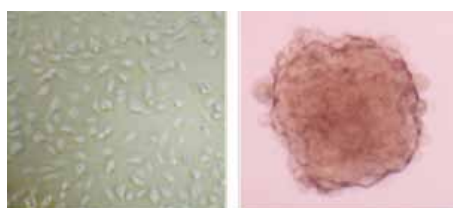
細胞数と発光量の相関関係

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。



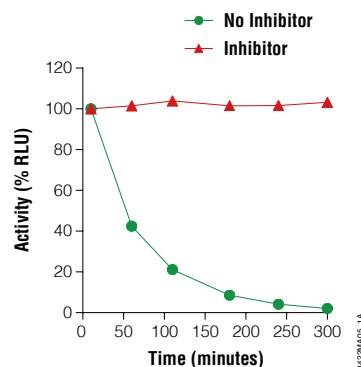
## CellTiter-Glo® Assay と従来法との比較

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ゼン産物を測定。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 (100µl)。CellTiter-Glo® Reagent (100µl) または WST-1 (10 µl) 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に計算した。



## SNB-19 スフェロイドと ATP 含量の関係

250, 500, 1000, 2500, 5000, 10,000 cells/drop で播種した 4 日後の SNB-19 (ヒトグリア芽腫細胞) スフェロイドのサイズと ATP 含量は非常に優れた直線性を示した ( $r^2=0.99$ )。左上パネル: 標準的な単層培養 (2D)。右上パネル: スフェロイド培養 (3D)



## CellTiter-Glo® Reagent による ATPase 活性の阻害

L929 細胞ライセートを 2 つのプールに分けて HEPES (no inhibitor) または CellTiter-Glo® Buffer (inhibitor) を添加し、22°C でインキュベーションした。経時的にサンプルを分取し CellTiter-Glo® Substrate で測定した。

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
細胞生存性試験 (発光・ATP)			

## アッセイシステム

CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	10ml	G7570	13,000
	10X10ml	G7571	55,000
	100ml	G7572	49,500
	10X10ml	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。



# 細胞毒性試験 (プロテアーゼマーカー)

## マルチプレックス分析に最適なプロテアーゼマーカー

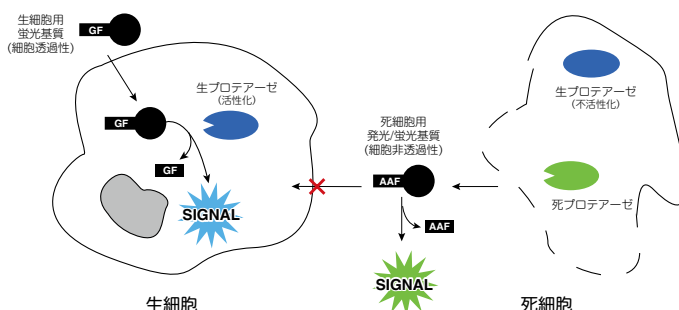
プロメガが発見した生細胞、死細胞に特異的なプロテアーゼ活性を利用

### プロテアーゼマーカー

プロメガでは細胞毒性あるいは細胞生存性にリンクする恒常的プロテアーゼ活性をペプチドベースのスクリーニングにより発見しました。これらのプロテアーゼ活性は特異的な配列を有するペプチド基質を用いた発光法あるいは蛍光法で検出することが容易であり、しかもアッセイ系を比較的容易に設計できるため、複数のパラメーターを同時に測定するマルチアッセイに最適です。

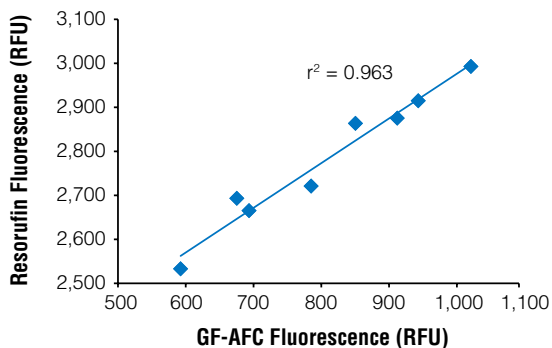
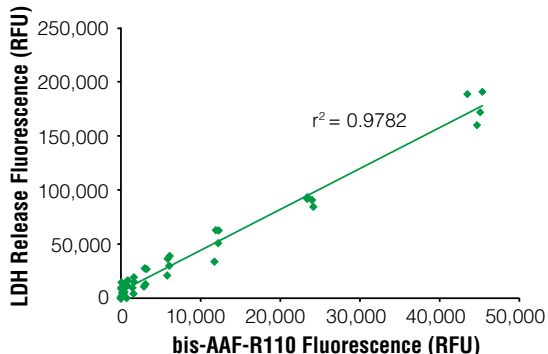
生細胞プロテアーゼ (LCP : Live Cell Protease) は細胞透過性のペプチド基質 (蛍光:GF-AFC) を用いて測定します。この生細胞プロテアーゼマーカーは、細胞膜の完全性が失われて周囲の培地に漏出すると不活性化され、生細胞で起こるような反応は見られなくなります。一方、死細胞プロテアーゼ (DCP : Dead Cell Protease) マーカーは細胞膜の完全性が失われた細胞から漏出して初めて測定されます。この活性は細胞非透過性のペプチド基質 (蛍光:AAF-R110または発光:AAF-Glo™) で測定します。

これらの基質を採用した新しい細胞増殖試験、細胞毒性試験キットを開発し、細胞死のメカニズムを解析するためにこれらのシステムを組み合わせたマルチアッセイシステムを揃えました。また、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)。



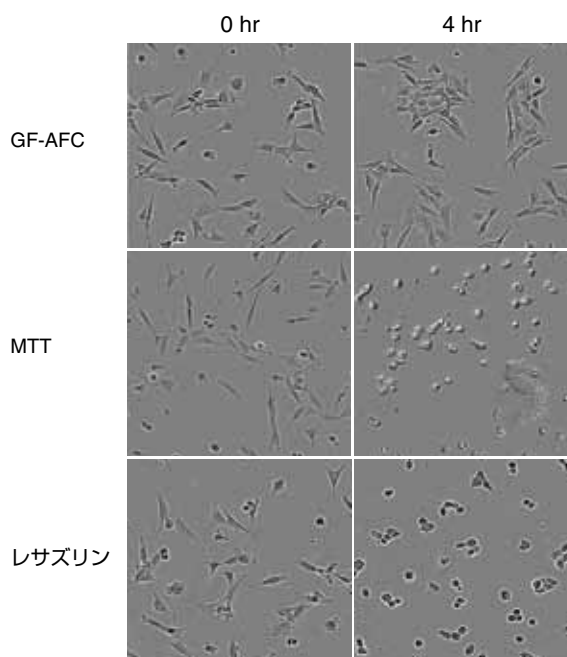
### 新しい細胞生存性・毒性試験の測定原理

GF-基質は生細胞に透過し、“生細胞”プロテアーゼ (LCP) による切断でシグナルを生じる。AAF-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) によりシグナルを生じる。



### 従来の細胞毒性試験、細胞生存性との相関性

上パネル. 死細胞の希釈系列サンプルからの CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay シグナルを LDH 放出アッセイ (CytoTox-ONE™ Assay) からの値に対してプロットした。下パネル. 生細胞の希釈系列サンプルからの CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay シグナルを Resorufin を利用した NADH 還元能アッセイ (CellTiter-Blue® Cell Viability Assay) からの値に対してプロットした。



### GF-AFC および MTT、レサズリンの毒性比較

Balb 3T3 細胞を各細胞生存試験用の発色 / 蛍光基質とともに 4 時間インキュベーションした後、同一視野を観察した。MTT およびレサズリンでは 4 時間後に明らかな細胞形態の変化が認められたが GF-AFC では変化はみとめられなかった。Images captured using Incucyte instrument from Essen Biosciences

## 細胞毒性試験 (プロテアーゼマーカー)

### シングルアッセイ

#### CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay (蛍光: 細胞生存性)

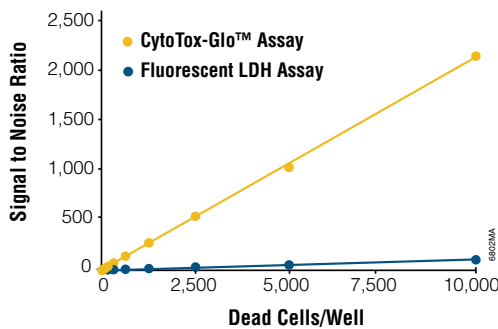
蛍光基質 (GF-AFC) を用いて細胞生存性を測定します。発光法をはじめとする様々なアッセイ法との相性が良く、同一ウェル内で他の測定反応と組み合わせた連続マルチプレックスアッセイが行え、細胞数で補正された正確な値を得ることができます。

#### CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay (蛍光: 細胞毒性)

蛍光基質 (bis-AAF-R110) を用いて細胞毒性を測定します。発光アッセイやスペクトルが識別できる他の蛍光アッセイ法 (カスパーゼの活性化、レポーター遺伝子の発現、生存性試験) とのマルチアッセイを想定してデザインされています。

#### CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay (発光: 細胞毒性)

発光基質 (AAF-Glo™) を用いて細胞毒性を測定します。非常に高感度で従来のLDHアッセイと優れた相関性を示します。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。



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

### デュアルアッセイ

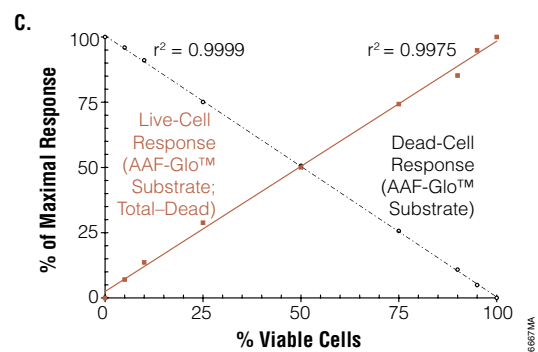
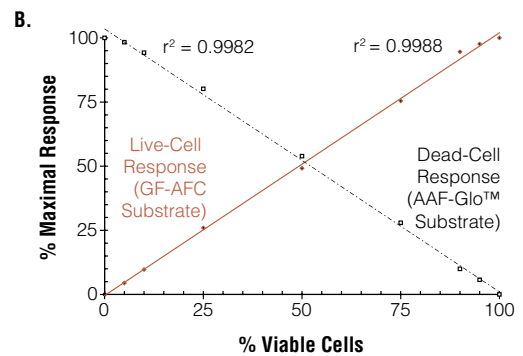
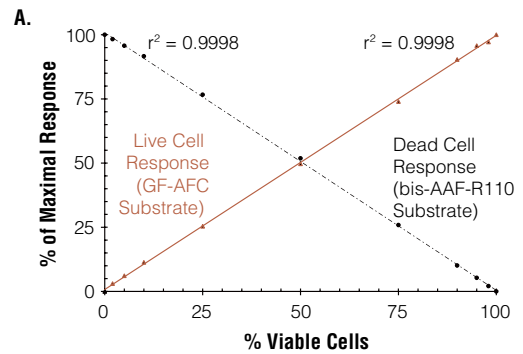
#### MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay (蛍光 - 発光: 細胞生存性 - 細胞毒性)

#### MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay (蛍光 - 蛍光: 細胞生存性 - 細胞毒性)

蛍光と発光あるいは蛍光波長の違いを利用して同じウェル内で細胞生存性と細胞毒性を連続して測定することができます。1つめのアッセイは蛍光基質 (GF-AFC) を利用して細胞生存性を測定します。2つめのアッセイではそれぞれ AAF-R110 (MultiTox-Fluor Assay) または AAF-Glo™ (MultiTox-Glo Assay) を用いて細胞毒性を測定します。データのウェル間補正のための比率測定を行うことができ、2つの独立した測定チャンネルを確保することによりアッセイへの干渉を容易に認識することができます。

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
<b>細胞生存性試験 (シングルアッセイ)</b>			
CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay	10ml	G6080	15,000
	5X10ml	G6081	61,000
	2X50ml	G6082	94,000
CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay	10ml	G9260	15,000
	5X10ml	G9261	61,000
	2X50ml	G9262	94,000
CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay	10ml	G9290	16,500
	5X10ml	G9291	67,000
	2X50ml	G9292	103,500

・ 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。



#### 各プロテアーゼマーカーを組み合わせたレシオメトリックな応答

Jurkat 細胞 (100,000 cells/ml) を 2 つに分け、1 つに細胞毒性処理を施し、もう 1 つを未処理とした。2 つの細胞プールを様々な割合で混和し、様々な細胞生存性を擬似的に再現した (0-100%)。CytoTox-Glo™, MultiTox-Fluor および MultiTox-Glo Assay を用いて測定した。得られたデータを生細胞レスポンス、死細胞レスポンスを最大レスポンスに対する % として補正した。パネル A. MultiTox-Fluor Assay. パネル B. MultiTox-Glo Assay. パネル C. CytoTox-Glo™ Assay (細胞溶解プロトコル)。

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
<b>細胞生存性・毒性試験 (デュアルアッセイ)</b>			
MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay	10ml	G9270	29,500
	5X10ml	G9271	83,500
MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay	10ml	G9200	27,000
	5X10ml	G9201	76,000

・ 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。



# 細胞毒性試験 (LDH, 還元能)

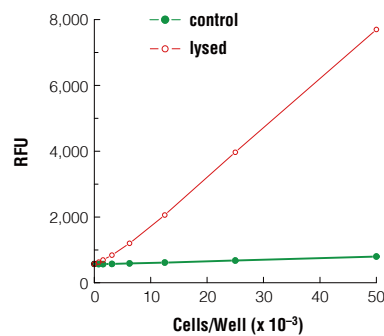
## 実績のあるトラディショナルバイオマーカー

乳酸脱水素酵素 (LDH) と還元能力 (NADH など) を発色法と蛍光法で測定

### 乳酸脱水素酵素 (LDH)

#### CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay (蛍光: 細胞毒性)

細胞膜にダメージを受けた細胞から漏出された乳酸脱水素酵素 (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。細胞質局在分子の漏出を検出することにより、生存活性を失った細胞を測定する方法は各種あり、広く用いられている手法です。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、Stop Solutionを加え、蛍光を測定 (励起波長560nm、蛍光波長 590nm) します。



CytoTox-ONE™ を用いた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。

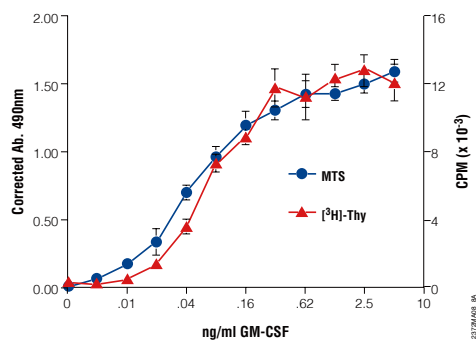
#### CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (発色: 細胞毒性)

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。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。

### 還元能力 (NADH など)

#### CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (蛍光・発色: 細胞生存性)

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。アッセイあたりのコストが非常に低く、コストパフォーマンスに優れます。発色法でも検出可能ですが、感度は蛍光検出が優れます。



GM-CSF により刺激された HT-2 細胞の増殖における CellTiter 96® AQueous One Solution と [3H]thymidine 取り込み試験との比較

#### CellTiter 96® AQueous One Solution

#### Cell Proliferation Assay (発色: 細胞生存性)

新しいテトラゾリウム化合物[3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -5- (3-carboxymethoxyphenyl) -2- (4-sulfophenyl) -2H-tetrazolium, inner salt (MTS) ]と電子捕獲剤phenazine ethosulfate (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、CellTiter 96® AQueous One Solution Assayは作業行程を短縮することができます。

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
<b>細胞毒性試験 (LDH)</b>			
<b>蛍光法</b>			
CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay	200 回分	G7890	16,000
	1,000 回分	G7891	49,000

・表示の回数は 96 ウェルプレートの場合。

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
<b>発色法</b>			
CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	1,000 回分	G1780	35,000

・表示のサイズは 96 ウェルプレートの場合。

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
<b>細胞生存試験 (NADH など)</b>			
<b>蛍光法</b>			
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	20ml	G8080	16,000
	100ml	G8081	45,000
	10X100ml	G8082	390,000

・ 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。

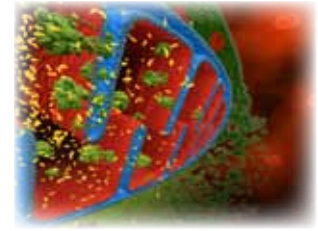
製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
<b>発色法</b>			
CellTiter 96® AQueous One Solution	1,000 回分	G3580	22,000
Cell Proliferation Assay	5,000 回分	G3581	72,000
	200 回分	G3582	6,000

・表示のサイズは 96 ウェルプレートの場合

細胞毒性試験 (ミトコンドリア毒性)

ミトコンドリア毒性を簡便に検出

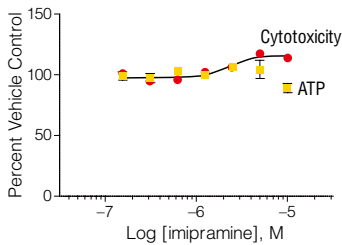
ミトコンドリア毒性と細胞毒性を分離検出



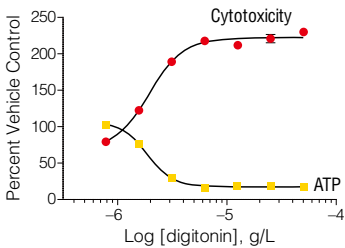
Mitochondrial ToxGlo™ Assay **NEW**

マルチアッセイでミトコンドリア機能障害性と細胞毒性を一挙に測定！

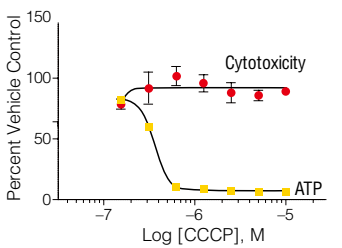
Mitochondrial ToxGlo™ Assay は 2 種類の試薬を連続して添加するマルチアッセイケミストリーを採用したセルベースアッセイシステムで、生体異物暴露による潜在的なミトコンドリア機能障害の予測に利用することができます。本アッセイでは細胞膜損傷に関するマーカーと細胞内 ATP の 2 つのバイオマーカーを測定し、短時間暴露においてピークルコントロール細胞と比較します。まず最初にネクロシスに関連した”死細胞プロテアーゼ活性”を測定するための蛍光ペプチド基質 (bis-AAF-R110) を用いて細胞膜の完全性を判定します。bis-AAF-R110 Substrate は生細胞の細胞膜を透過できないため生細胞ではシグナルを生じません。次に ATP detection reagent を加えて細胞を溶解し、ATP 量に比例した発光シグナルを測定します。得られた 2 つのデータセットは、ミトコンドリアの機能障害あるいはミトコンドリアに関連しない細胞毒性メカニズムを反映したプロファイル作成に使用できます。



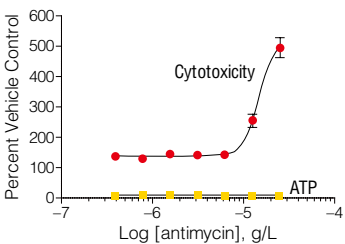
ATPおよび細胞膜の完全性に  
変化なし  
→ ミトコンドリア毒性なし



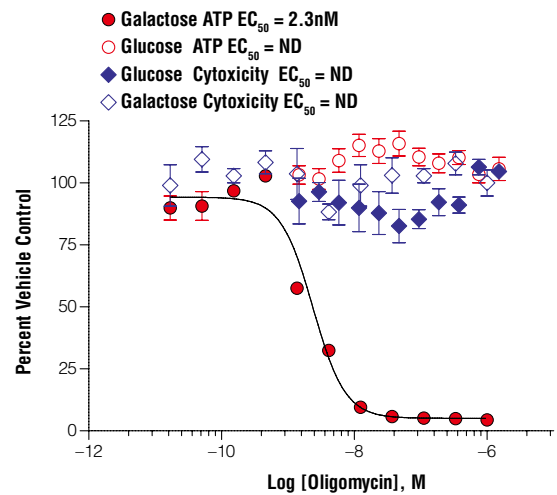
ATPおよび細胞膜の完全性が  
協調的に低下  
→ プライマリーネクロシス



細胞膜の完全性に变化なく、  
ATP低下  
→ ミトコンドリア毒性



ATPの枯渇ともなう  
用量依存的な細胞膜完全性の低下  
→ ミトコンドリア毒性



ガラクトースまたはグルコース存在下における代表的なミトコンドリア毒に対する応答

グルコース存在下で処理した細胞は生体エネルギーの要求性に従いグルコースに依存し、ミトコンドリア毒に対して比較的無反応 (Glucose ATP)。ガラクトース存在下で処理した細胞は ATP 産生に酸化リン酸化を利用しなければならず、ミトコンドリア毒性に対する応答性が高くなった (Galactose ATP)。オリゴマイシン処理ではどちらの培地組成でも細胞膜の完全性は変化しなかった (Glucose Cytotoxicity および Galactose Cytotoxicity)。表示のデータは 96- ウェルプレートフォーマットで 1 ウェルあたり 10,000 個の K562 細胞より得られたもので、細胞は 2 時間オリゴマイシンに暴露した。

ミトコンドリア毒性の代表的なプロファイル

K562 細胞 (10,000 細胞 / ウェル) はグルコースフリー (ガラクトース添加) RPMI 培地で 2 時間段階希釈した化合物で処理した。

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
ミトコンドリア毒性試験 Mitochondrial ToxGlo™ Assay	10ml	G8000	26,000
	100ml	G8001	125,000

・ 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。

## カスパーゼを最も簡便に測定

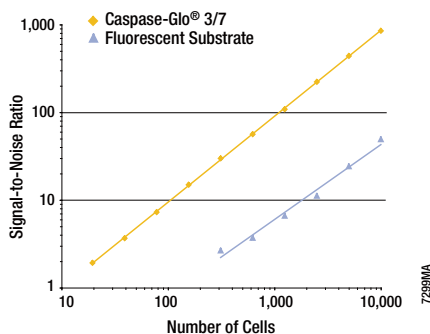
アポトーシス、ネクローシスなど細胞死メカニズムを簡便に解析

シングルアッセイ

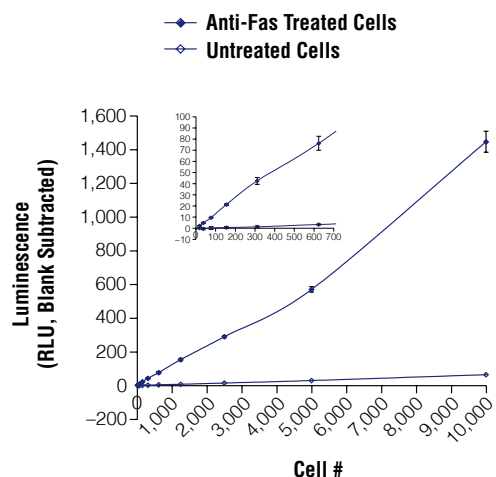
### Caspase-Glo® Assay (発光: カスパーゼ3/7)

#### 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ースystem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。また、アポトーシスを判定するTUNEL法、抗体法などに比べ飛躍的に簡便になっています。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® 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。

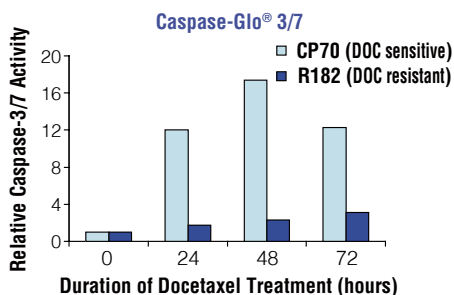
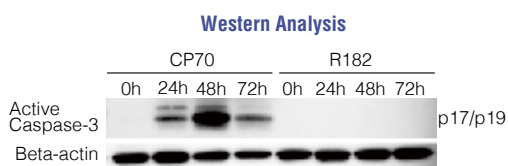


蛍光法と Caspase-Glo® の感度とダイナミックレンジの比較



#### 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。



ウエスタン分析と Caspase-Glo® の相関性

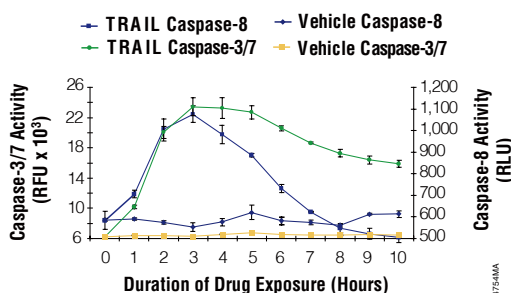
製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
<b>発光・カスパーゼアッセイ</b>			
<b>アッセイシステム</b>			
Caspase-Glo® 3/7 Assay	2.5ml	G8090	17,500
	10ml	G8091	66,000
	100ml	G8092	319,000
Caspase-Glo® 8 Assay	2.5ml	G8200	17,500
	10ml	G8201	66,000
Caspase-Glo® 9 Assay	2.5ml	G8210	17,500
	10ml	G8211	66,000

・ 10ml は 96 ウェルプレートで 100 ウェル分

## 細胞毒性試験（細胞死メカニズム）

### Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay（蛍光：カスパーゼ3/7）

蛍光基質 Z-DEVD-rhodamine 110によりカスパーゼを測定します。カスパーゼ3/7の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。発光法のCaspase-Glo® 8または9を組み合わせたアポトーシスマカニズムの解析にも使用することができます（下グラフ参照）。



### 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 またはピ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 時間ずつずらして 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。

### トリプルアッセイ

#### ApoTox-Glo™ Triplex Assay（蛍光-発光：細胞生存性-細胞毒性-アポトーシス）

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。細胞毒性および細胞生存性に対する新規なプロテアーゼ活性を蛍光で測定（6 ページ参照）し、カスパーゼ 3/7 活性は発光法により測定します（Caspase-Glo® 3/7）。1 つのサンプルから細胞死のメカニズムを決定することができます（右図参照）。

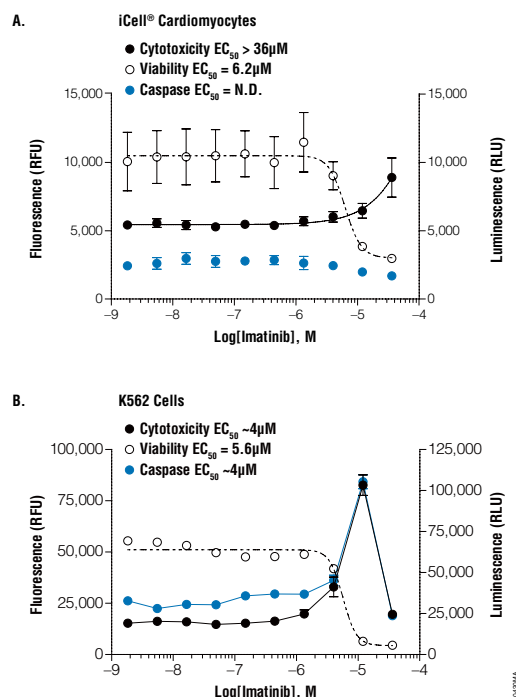
### デュアルアッセイ

#### ApoLive-Glo™ Multiplex Assay（蛍光-発光：細胞生存性-アポトーシス）

細胞生存マーカーとして生細胞プロテアーゼ（6 ページ参照）を、アポトーシスマーカーとしてカスパーゼの活性化（Caspase-Glo® 3/7）を 1 ウェルで測定し、細胞死のメカニズムを決定することができます。カスパーゼ活性と生存細胞の比率はカスパーゼ活性化量の決定および細胞数に対する補正に有用です。

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
<b>蛍光・カスパーゼアッセイ</b>			
<b>アッセイシステム</b>			
Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay	1ml	G7792	6,000
	10ml	G7790	58,000
	100ml	G7791	280,000
Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Buffer	100ml	G7781	190,000

\* 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



### イマチニブ処理した iCell® Cardiomyocytes（iPS 細胞由来心筋細胞）および K562（ヒト慢性骨髄性白血病細胞）の細胞毒性プロファイル

ApoTox-Glo™ Triplex Assay を使用して細胞毒性、細胞生存性、カスパーゼ活性のトリプルアッセイを行った。高濃度のイマチニブ（1μM）でどちらの細胞株とも細胞生存性が低下した。K562 細胞の細胞死メカニズムはカスパーゼ 3/7 活性の増加によるアポトーシスとそれに付随した細胞毒性の増加であることが示された。

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
<b>アポトーシス + 細胞生存性 + 細胞毒性 アッセイシステム</b>			
<b>トリプルアッセイ</b>			
ApoTox-Glo™ Triplex Assay	10ml	G6320	75,000
	5×10ml	G6321	230,000
<b>デュアルアッセイ</b>			
ApoLive-Glo™ Multiplex Assay	10ml	G6410	70,000
	5×10ml	G6411	210,000

・ 10ml は 96 ウェルプレートで 100 ウェル分

## 酸化ストレス：GSH & GSSGの測定

細胞内の酸化／還元状態を迅速、高感度に解析

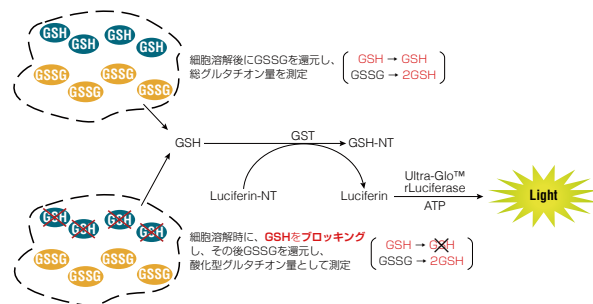
### GSH/GSSG-Glo™ Assay

#### 除タンパク操作の不要な高感度グルタチオンアッセイ

化合物には細胞内の活性酸素の発生を誘導するものが多く存在し、その結果与えられる細胞へのダメージにより最終的にアポトーシスやネクローシスを起こす場合もあります。還元型と酸化型のグルタチオンの比率（GSH/GSSG比）を求めることで、これらの化合物による細胞内酸化還元電位状態の変化量を調べることができます。GSH/GSSG-Glo™ Assay は、培養細胞内の総グルタチオン（GSH + GSSG）、GSSG、GSH/GSSG比を簡単に検出、定量するための発光アッセイシステムです。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。

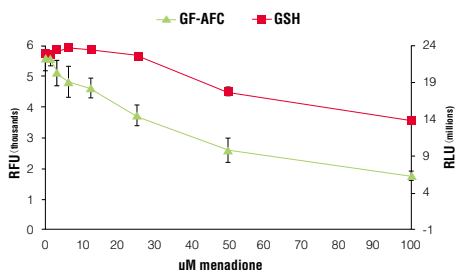
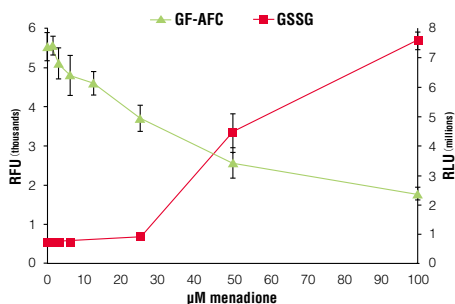
- ・ **生体に近い GSH/GSSG 比**：総グルタチオンや GSSG の実質レベルを細胞培養ウェルで直接測定できるので、従来法に比べて GSH や GSSG のロスを抑えサンプルの調製作業や間接的な GSSG 算出も必要ありません。
- ・ **頑健なパフォーマンス**：生物発光技術およびシンプルなプロトコルにより、サンプルのハンドリングやバラツキが低減。
- ・ **シンプルなプロトコル**：マルチウェルプレート内の細胞に直接試薬を添加する“ホモジニアスな”添加 - 混和 - 測定”形式で、従来法のような時間のかかる除タンパクや遠心操作が不要。
- ・ **高い感度**：感度が高いの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)



#### GSH/GSSG-Glo™ の測定原理

GSH 依存的に Luciferin-NT (GSH プロブ) 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く。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。総グルタチオンの測定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。酸化型の GSSG のみの測定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、残った GSSG を GSH に変換して発光反応で定量。



メナジオン濃度ともなう GSH、GSSG レベルおよび細胞生存性の変化  
肺腺癌細胞 A549 細胞 5,000 個 / ウェル (96 ウェルプレート) をメナジオンで 30 分間処理した後、CellTiter-Fluor™ (GF-AFC) で細胞生存性を測定した。続いて、GSH/GSSG-Glo™を用いて GSSG および GSH を測定した。

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
<b>グルタチオンアッセイシステム</b>			
<b>酸化型・還元型・比率</b>			
GSH/GSSG-Glo™ Assay	10ml	V6611	79,000
	50ml	V6612	316,000
・ 10ml は 96 ウェルプレートで 100 ウェル分 (総グルタチオンまたは GSSG 100 ウェル分、GSH/GSSG 比の決定なら 50 ウェル分)			
<b>還元型</b>			
GSH-Glo™ Glutathione Assay	10ml	V6911	60,500
	50ml	V6912	247,500

・ 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。

## 解毒活性測定 (P450活性)

## 薬物代謝：P450の測定

## 発光法による細胞ベースの P450 アッセイ

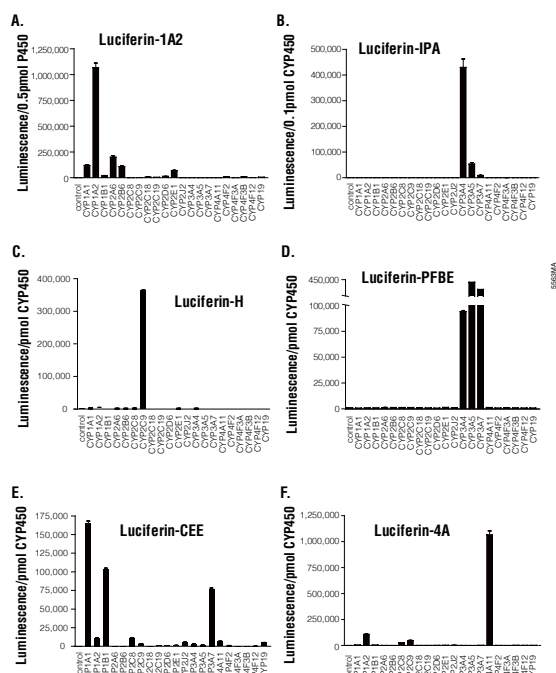
## P450-Glo™ Assay

## 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ーシステムを組み合わせることにより実現しました。

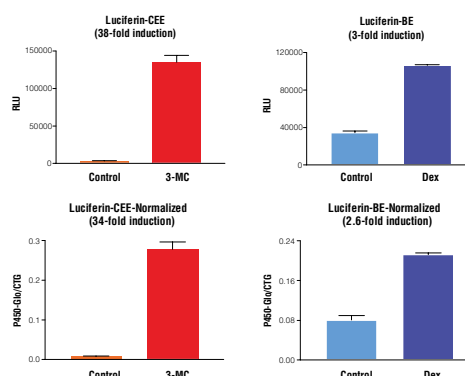
P450発光基質および反応産物(ルシフェリン)は細胞透過性であるため細胞ベースのアッセイが可能です。発光性基質と培養細胞をインキュベートすると細胞内のCYP酵素により変換されたルシフェリンは、非溶解アッセイ(細胞上澄を移してアッセイ)あるいは溶解アッセイ(細胞を含むウェルでアッセイ)で測定されます。非溶解アッセイの場合、P450活性測定後に残る細胞を利用して他の細胞ベースアッセイを行うことができます(細胞生存性試験: CellTiter-Glo®など)。P450-Glo™ Assayを用いた細胞ベースのアプリケーションとして、基底CYP活性の測定、テスト化合物による活性誘導、テスト化合物による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



## 生細胞数で補正した P450 アッセイデータ

初代培養ラット肝細胞を用いて P450-Glo™ アッセイを行った。細胞は CYP450 遺伝子誘導剤 (3-メチルコラントレンまたはデキサメタゾン) で 2 日間処理した。その後、P450-Glo™ Substrate を培地に加え、4 時間インキュベーションした。培地 100µl を取り出し、等量の P450-Glo™ Luciferin detection reagent と混和した。下 2 つのグラフでは引き続き CellTiter-Glo® Assay により細胞生存性を測定し、それにより補正した P450 活性を示した。化合物による処理は P450 活性を誘導したが、細胞死は誘導しなかった。

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
<b>P450 アッセイ</b>			
<b>アッセイシステム</b>			
P450-Glo™ CYP1A2 Induction/Inhibition Assay	10ml	V8421	18,500
	50ml	V8422	55,000
P450-Glo™ CYP3A4 Assay with Luciferin-IPA	10ml	V9001	18,500
	50ml	V9002	55,000
P450-Glo™ CYP3A4 Assay (Luciferin-PFBE) Cell-Based/Biochemical Assay	10ml	V8901	18,500
	50ml	V8902	55,000
P450-Glo™ CYP1A1 Assay (Luciferin-CEE)	10ml	V8751	18,500
	50ml	V8752	55,000
P450-Glo™ CYP2C9 Assay (Luciferin-H)	10ml	V8791	18,500
	50ml	V8792	55,000
Luciferin-4A	3mg	P1621	33,000

・ 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)。

## ADCCアッセイ (レポーターアッセイ)

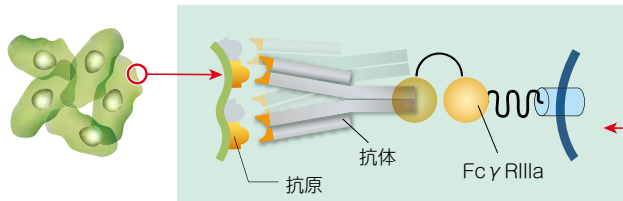
従来の ADCC アッセイよりも飛躍的に簡便でバラツキも低減されます！

### ADCC Reporter Bioassay Kit NEW

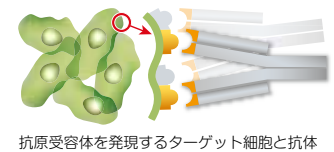
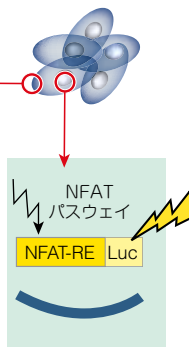
抗体医薬の開発、製造管理に最適です。

抗体依存性細胞傷害 (ADCC: Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) は、細胞性免疫系によるウイルス感染細胞あるいはその他罹患細胞を標的とした傷害性に関連する抗体の作用機序の一つであり、抗体医薬の開発などに応用されています。抗体が細胞表面の標的抗原に結合し、抗体のFcエフェクター部位もエフェクター細胞 (主にナチュラルキラー細胞) のFcγRIIIa受容体に結合すると2種類の細胞がクロスリンクを形成し、ADCCの作用機序パスウェイが活性化されます。通常のADCCアッセイはこの機序によりターゲット細胞が傷害され、その死細胞を測定します。ADCC Reporter BioassayはNFATシグナル経路の活性化を指標として治療用抗体Fc領域のエフェクター機能を定量するための生物発光レポーターアッセイです。ADCCの作用機序活性化におけるエフェクター細胞のNFAT (T細胞核内転写因子) パスウェイを通じた転写活性化をとらえ、ルシフェラーゼレポーターアッセイで定量します。エフェクター細胞として、FcγRIIIa 受容体, V158 (高親和性) バリエーションを安定に発現し、ホタルルシフェラーゼの発現を駆動するNFAT応答配列を安定に保持する遺伝子組換えJurkat細胞を用います。従来法で使用するそのエフェクター細胞は応答性が非常に変わりやすく、調製が面倒でバックグラウンドが高くなる場合が多くありましたが、本製品は短時間 (1日) でバラツキが少なく高精度のバイオアッセイを行うことができ、抗体医薬の研究、開発からロット管理試験にまで利用することができます。

ターゲット細胞

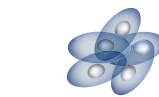


エフェクター細胞  
(遺伝子組換えJurkat 細胞)

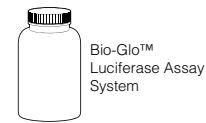


抗原受容体を発現するターゲット細胞と抗体

FcγRIIIa/NFAT-RE-luc2レポーターを含む Jurkat エフェクター細胞



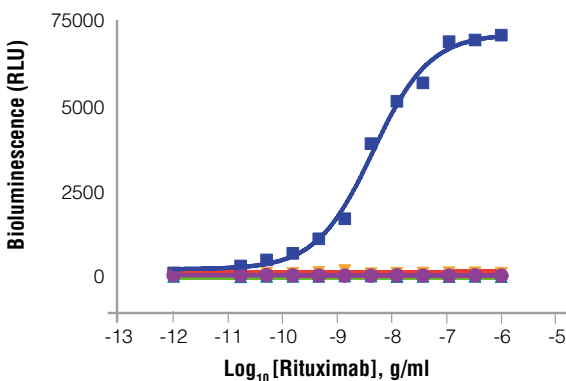
インキュベーション (6~25時間)



ADCC Reporter Bioassay のプロトコル

#### ADCC Reporter Bioassay の概要

NFAT 応答配列により発現制御されるホタルルシフェラーゼの発光シグナルを測定。



#### 特異性に優れた ADCC Reporter Bioassay

リツキシマブ (anti-CD20 キメラモノクローナル抗体薬)、トラスツズマブ (anti-Her2 ヒト化モノクローナル抗体薬)、コントロール培地 (抗体なし) の段階希釈系列を遺伝子組換え型 Jurkat エフェクター細胞 (ADCC Bioassay Effector Cells) とともに ADCC Bioassay Target Cells (WIL2-S) の存在下あるいは非存在下で 37℃、6 時間インキュベーションした。ルシフェラーゼ活性は Bio-Glo™ Reagent を用いて定量し、データは GraphPad Prism® ソフトウェアの 4PL curve fitting を用いてフィッティングした。

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
<b>ADCC アッセイシステム</b>			
ADCC Reporter Bioassay, Complete Kit (WIL2-S)	1Kit	G7014	120,000
ADCC Reporter Bioassay, Core Kit	1Kit	G7010	100,000
	5Kit	G7018	450,000
ADCC Bioassay Effector Cells, Propagation Model	1 セット	G7102	お問い合わせ下さい
ADCC Reporter Bioassay, Target Kit (WIL2-S)	1Kit	G7013	45,000
Bio-Glo™ Luciferase Assay System	100ml	G7940	130,000

・ G7014, G7010 は 96 ウェルプレートの場合 120 ウェル分

※細胞購入における注意点: ADCC Bioassay Effector Cells, ADCC Bioassay Target cells 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。

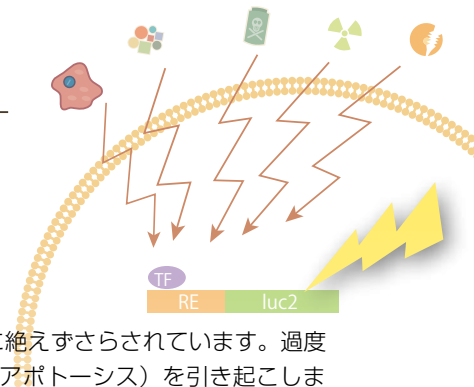
ストレスシグナルの検出

ストレス応答アッセイ (レポーターアッセイ)

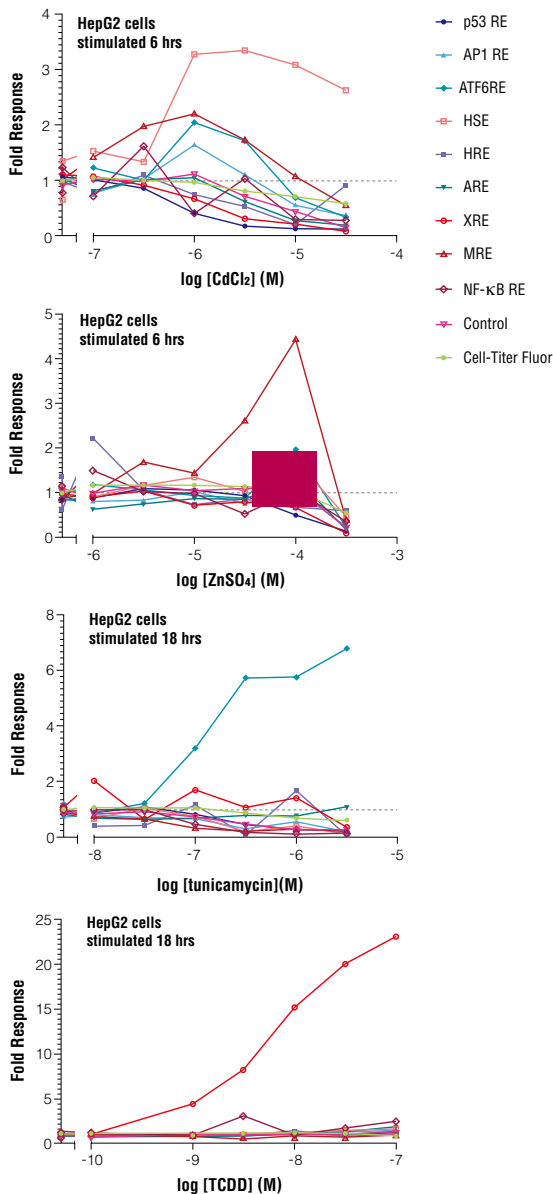
各種ストレス応答配列を利用したレポーターアッセイ

Reporter Assay for Cell Stress

各種ストレス応答を簡便に検出。



細胞は化学物質による毒性のほか、紫外線、放射線、温度、物理的刺激など様々なストレスに絶えずさらされています。過度なストレスは、細胞が生来備えている恒常性を破綻させ、細胞自らが死を選択する細胞死（アポトーシス）を引き起こします。これらのストレスには細胞内のストレス応答機構が反応することが分かっています。レポーターアッセイは、このようなストレス応答機構を含め、細胞の広範なシグナル経路の解析ができます。ある種の細胞ストレスは、細胞レベルでのストレスのみならず個体レベルでのストレスにも応答します。したがって、その異常は、分子・細胞レベルでの現象に止まらず、自己免疫疾患や癌などの疾病をも引き起こすことになり、その解明を通じて創薬、新規治療への応用などが期待されます。プロメガでは種々の細胞ストレスに対する応答エレメントを搭載した、レポーターベクターシリーズを開発しました。これらのベクターを用いたレポーターアッセイにより、細胞ストレスのシグナル伝達経路の特定、各種細胞のストレス耐性の検討、ストレス化合物の毒性評価などの解析が可能です。



応答エレメントとストレス応答

ベクター	応答エレメント	シグナル経路
pGL4.37	抗酸化剤応答配列 (ARE)	酸化ストレス
pGL4.38	p53 応答配列 (p53 RE)	DNA 損傷
pGL4.39	活性化転写因子 6 応答配列 (ATF6 RE)	小胞体ストレス
pGL4.40	金属応答配列 (MRE)	重金属ストレス
pGL4.41	熱ショック配列 (HSE)	熱ショック
pGL4.42	低酸素応答配列 (HRE)	低酸素ストレス
pGL4.43	生体異物応答配列 (XRE)	生体異物ストレス
pGL4.44	AP1 応答配列 (AP1 RE)	MAPK/JNK

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
<b>ストレスアッセイ</b>			
<b>ストレスモニタリング用レポーターベクター</b>			
pGL4.37[luc2P/ARE/Hygro] Vector	20µg	E3641	64,000
pGL4.38[luc2P/p53 RE/Hygro] Vector	20µg	E3651	64,000
pGL4.39[luc2P/ATF6 RE/Hygro] Vector	20µg	E3661	64,000
pGL4.40[luc2P/MRE/Hygro] Vector	20µg	E4131	64,000
pGL4.41[luc2P/HSE/Hygro] Vector	20µg	E3751	64,000
pGL4.42[luc2P/HRE/Hygro] Vector	20µg	E4001	64,000
pGL4.43[luc2P/XRE/Hygro] Vector	20µg	E4121	64,000
pGL4.44[luc2P/AP1 RE/Hygro] Vector	20µg	E4111	64,000
pGL4.32[luc2P/NF-κB-RE/Hygro]Vector	20µg	E8491	64,000
<b>レポーターアッセイ試薬</b>			
ONE-Glo™ Luciferase Assay System	10ml	E6110	18,500
	100ml	E6120	121,000
ONE-Glo™ + Tox Luciferase Reporter and Cell Viability Assay	1 プレート分	E7110	27,000
	10 プレート分	E7120	172,000
<b>トランスフェクション試薬</b>			
FuGENE® HD Transfection Reagent	1ml	E2311	55,000
	5X1ml	E2312	220,000

※ベクター購入における注意点：pGL4 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（www.promeqa.com.jp/license/）をご確認いただく必要があります。

同一プレートでのストレス応答パネルに対する化合物プロファイリング

HepG2 細胞に各ストレス応答配列を含む DNA をトランスフェクションした後、96 ウェルプレートに移し O/N でインキュベーションした。各化合物で処理し、CellTiter-Fluor™ で細胞生存性を蛍光で測定した後に ONE-Glo™ でルシフェラーゼレポーターを測定した。

## GloMax®-Multi+ Detection System

高感度な発光測定、蛍光を組み合わせたマルチアッセイにも最適です。

GloMax®-Multi+Detection Systemは、進化型のプレートリーダーで、デフォルトの発光測定機能に蛍光あるいは吸光測定機能を追加できる柔軟性を有しています。6~384プレートに対応し、シェーカー機能が備わり、オプションでヒーターを取り付けることもできます。プロメガの各種アッセイ試薬用のプログラムが予めインストールされているのではじめての方にも安心してご利用いただけます。



GloMax®-Multi+ Detection System with Instinct™ Software

製品名	サイズ	カタログ番号	数量	価格 (¥)
<b>検出システム</b>				
GloMax®-Multi+ Luminescence System with Instinct™ Software with Shaking (本体+シェーカー)	1 セット	E8032L	1	2,650,000
GloMax®-Multi+ Luminescence System with Instinct™ Software with Shaking and Heating (本体+シェーカー+ヒーター)	1 セット	E9032L	1	2,850,000
GloMax®-Multi+ Luminescence System with Instinct™ Software with Shaking and Dual Injector (本体+シェーカー+デュアルインジェクター)	1 セット	E8032LD	1	3,300,000
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	1	3,500,000
<b>オプション</b>				
GloMax®-Multi+ Fluorescence Module (蛍光ユニット)	1 セット	E8051	1	550,000
GloMax®-Multi+ Visible Absorbance Module (吸光ユニット [可視光])	1 セット	E8061	1	350,000
GloMax®-Multi+ UV-Visible Absorbance Module (吸光ユニット [UV/可視光])	1 セット	E9061	1	800,000
GloMax®-Multi Dual Injector System	1 セット	E7081	1	850,000

### 関連資料



**セルベースアッセイガイド**：細胞内マーカーとレポーターの効率的な測定細胞ベースで測定できる各種アッセイ試薬を一挙にご紹介。

[promega.co.jp/pdf/cba\\_guide.pdf](http://www.promega.co.jp/pdf/cba_guide.pdf)

**シグナル伝達ガイド**：抗体を使わない簡便な発光法による解析法より簡便で高感度な発光法を用いたシグナル伝達解析法をご紹介します。

[www.promega.co.jp/pdf/signalguide.pdf](http://www.promega.co.jp/pdf/signalguide.pdf)

**マルチアッセイガイド**：培養細胞からより多くの情報を引き出すヒント

培養細胞からより多くの情報を引き出すためのアッセイシステムおよびその組合せなどを解説。

[www.promega.co.jp/pdf/multi\\_assay.pdf](http://www.promega.co.jp/pdf/multi_assay.pdf)

**ADME/Toxプロダクトガイド**：高感度で迅速な発光法によるADME/Tox

細胞ベースでのCYP3A4アッセイを簡便に行うことができる発光プローブを始め、

ADME/Toxにスクリーニングに最適な発光測定システムを紹介。

[www.promega.co.jp/pdf/adme\\_tox.pdf](http://www.promega.co.jp/pdf/adme_tox.pdf)

日本語 Web site : [www.promega.co.jp](http://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](mailto: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2012年11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：