

Cell Based Assay & Analysis Guide

細胞状態の同定とレポーター解析

■ インTRODクシヨN

セルベース分析システム選択ガイド	2
ハイコンテンツ分析（情報量の増加）	4
ハイスループット分析（処理量の増加）	6

■ 細胞内在性マーカーの定量（細胞状態の同定）

細胞内マーカー測定 of 概要	7
細胞生存 & 毒性試験	9
アポトーシスアッセイ	16

■ 細胞外来性マーカーの定量と観察（レポーター解析）

レポーター解析 of 概要	18
デュアルルシフェラーゼアッセイ	20
シングルルシフェラーゼアッセイ	22
ライブセルルシフェラーゼアッセイ	23
セルイメージング	24

セルベース分析システム選択ガイド

細胞内在性マーカーの定量（細胞状態の同定）

製品名	標的分子	検出	シグナル安定性	測定時の細胞状態	試薬のショット数	試薬/サンプル比 (96ウェル板の場合)	ページ
細胞生存/毒性試験							
MultiTox-Fluor Assay	“生細胞由来” および “死細胞由来” のプロテアーゼ	蛍光 (400Ex/505Em) / (485Ex/520Em)	-	生細胞	1	100µl/100µl	9
CellTiter-Glo® Assay	ATP (エネルギー合成能)	蛍光	5時間以上	細胞溶解	1	100µl/100µl	10
CellTiter-Blue® Assay	NADH (還元能)	蛍光 発色 (560Ex/590Em) / (570nm)	24時間以内	生細胞	1 (~2')	20µl/100µl	12
CellTiter 96® Aqueous One Solution Assay	NADH (還元能)	発色 (490nm)	18時間以内	生細胞	1 (~2')	20µl/100µl	13
CytoTox-Fluor™ Assay	“死細胞由来” プロテアーゼ	蛍光 (485Ex/520Em)	-	生細胞	1	100µl/100µl	15
CytoTox-ONE™ Assay	LDH	蛍光 (560Ex/590Em)	2日* (約1~2時間)	生細胞	1 (~2')	100µl/100µl	14
アポトーシスアッセイ							
Apo-ONE® Caspase-3/7 Assay	Caspase-3/7	蛍光 (485Ex/530Em)	-	細胞溶解	1	100µl/100µl	17
Caspase-Glo® 3/7 Assay	Caspase-3/7	発光	4時間以上	細胞溶解	1	100µl/100µl	16
Caspase-Glo® 8 Assay	Caspase-8	発光	2時間以上	細胞溶解	1	100µl/100µl	16
Caspase-Glo® 9 Assay	Caspase-9	発光	2時間以上	細胞溶解	1	100µl/100µl	16

* Stop Solutionを添加した場合。
** Stop Solutionを添加し、培地に血清が含まれる場合（血清が含まれていない場合は1~2時間）

細胞外来性マーカーの定量と観察（レポーター解析）

製品名	標的分子	検出	シグナル安定性	測定時の細胞状態	試薬のショット数	試薬/サンプル比 (96ウェル板の場合)	ページ
レポーターアッセイ*							
Dual-Glo™ Assay System	ホタル/ウミシイタケルシフェラーゼ	発光	約2時間 / 約2時間	細胞溶解	2	2×75µl/75µl	20
Dual-Luciferase® Assay System	ホタル/ウミシイタケルシフェラーゼ	発光	約15分間 / 約2分間	細胞溶解 (別途細胞溶解操作が伴う)	2	100µl / ライセート20µl	20
Chroma-Glo™ Assay System	クリックビートルルシフェラーゼ (赤/緑)	発光	30分以上 / 5時間以上	細胞溶解	1	100µl/100µl	21
Steady-Glo® Assay System	ホタルルシフェラーゼ	発光	約5時間	細胞溶解	1	100µl/100µl	22
Bright-Glo™ Assay System	ホタルルシフェラーゼ	発光	約30分間	細胞溶解	1	100µl/100µl	22
EnduRen™ Substrate	ウミシイタケルシフェラーゼ	発光	24時間以上	生細胞 (マルチポイント)	0 **	-	23
ViviRen™ Substrate	ウミシイタケルシフェラーゼ	発光	数時間	生細胞 (マルチポイント)	0 **	-	23
イメージング*							
HaloTag™	HaloTag™	蛍光 : ** TMR (555Ex/580Em) FAM (494Ex/526Em) Coumarin (353Ex/434Em)	約1日 (リガンドによる標識後) **	生細胞 (マルチポイント)	0 **	-	24
MonsterGreen®	hMGFP (高蛍光 GFP)	蛍光 (480Ex/540Em)	約7日**	生細胞 (マルチポイント)	0	-	26

*1 レポーターアッセイ、イメージングにはレポーターベクターが必要です。ベクターについては28ページをご覧ください。
*2 試薬（基質、リガンド）は予め培地に溶解
*3 蛍光観察にはHaloTag™ タンパク質に蛍光リガンドが結合する必要があります。
*4 融合するタンパク質、蛍光物質、細胞の状態などにより異なります。

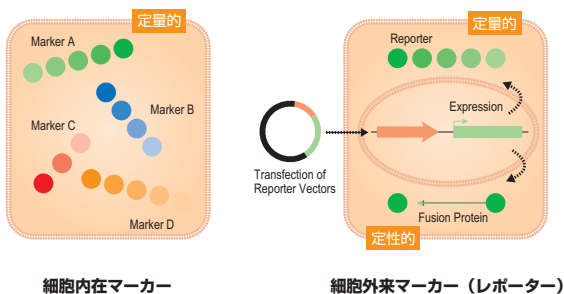
■ はじめに

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、細胞を用いた実験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処理能力や操作性にも優れます。今日では、ゲノミクス研究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、蓄積された分子生物学的技術を活かした新しいセルベースアッセイシステムを数多く開発しています。

■ セルベース分析法の種類

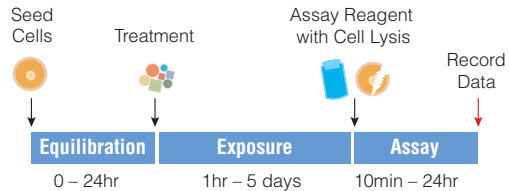
実際にセルベースアッセイのフォーマットを選択するには、処理期間が終わる時点でどのような情報について測定したいのかを明確にする必要があります。セルベースアッセイでは、もともと細胞に内在する代謝活性マーカーや酵素を測定する方法（細胞内在マーカーの測定）と、測定・検出が容易なタンパク質をコードする遺伝子を細胞内に導入して、細胞内事象の変化をその発現量あるいは動態として検知する方法（細胞外来マーカーの測定、観察）があります（下図参照）。現在、死細胞（細胞毒性試験）、生存細胞（細胞生存試験）、細胞死のメカニズム（例：アポトーシス）の指標となる種々な細胞内在マーカーを測定する方法（8ページ参照）、様々な細胞内現象の応答を伝達するレポーター酵素を測定する方法（レポーターアッセイ）が利用できます。さらに標的タンパク質の細胞内動態を観察できる標識タグ発現ベクターもセルベース分析に有効なツールです（18ページ参照）。プロメガの各種セルベース分析システムの特長については2ページの表をご覧ください。



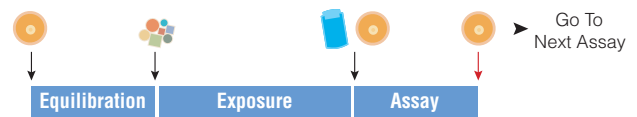
■ 標的を測定するタイムポイント

エンドポイントアッセイは様々な実験条件下での培養を一定時間行い、処理の終了した時点で細胞内で変化したマーカー・レポーターを測定する方法で、細胞を溶解して内容物を測定する方法と、細胞を破壊せずに測定する方法があります。マルチポイントアッセイは処理時間の経過に沿って生細胞内のレポーターを経時的に測定します。どちらのアッセイ法でも細胞を破壊せずに生きたまま標的マーカーを測定することができれば、同じサンプルをさらに別のアッセイに用いて情報量を増やすことができます（マルチプレックスアッセイ）。マルチポイントレポーターアッセイが行えるEnduRen™ / ViviRen™ Live Cell Substrateは細胞内現象の変化を経時的に追跡できます。また、標的タンパク質の遺伝子配列が既知の場合、HaloTag™ やGFPとの融合タンパク質を発現させ、細胞内での動態を経時的に観察することができます。

エンドポイントアッセイ (細胞溶解)



エンドポイントアッセイ (生細胞)



マルチポイントアッセイ (生細胞)



■ 処理能力とデータのクオリティー

操作性の向上（分注ステップ数の低減など）によるスピードアップ、感度の上昇（ミニチュア化など）にともなう処理量の増加は絶対的な分析処理能力を上げます。また、様々な化学反応、検出法を駆逐することでサンプル（細胞）あたりから得られる情報量を増やすことができればスクリーニング力を向上させ、不要な追加実験を排除することができ、消耗品コストの削減にもつながります。セルベース分析が様々な有用性を持つ一方で、細胞の生物学的な複雑系が原因となる予期しない毒性や細胞数の不均一性などによりデータのクオリティーが低下し、解析を複雑にすることがあります。処理能力・情報収集能力もさることながら、スクリーニングなどで得られたデータのクオリティーは非常に重要であり、クオリティーの高いデータは反復実験を低減し、次の解析につながる明確な判断材料を与えてくれます。プロメガでは、処理スピードを加速させ、情報量を増やしながらデータの持つクオリティーにも重点を置いたアッセイシステムの開発を行っています。

イントロダクション

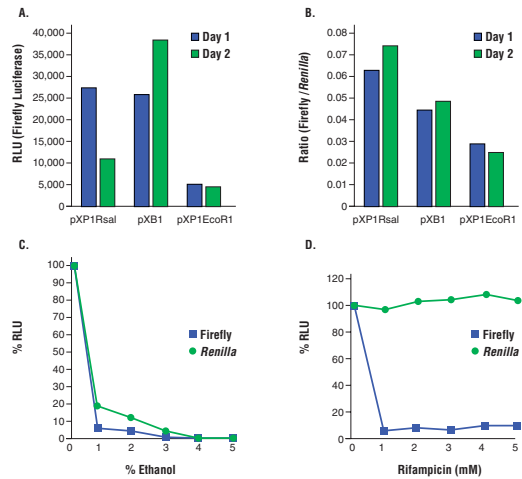
ハイコンテンツ分析 ～ 情報量の増加 ～

■ マルチアッセイ

同じサンプルから複数のパラメーターについて情報を入手できるマルチアッセイ（マルチプレックス）はこれからのセルベースアッセイには必須の技術になります。マルチプレックスの目的として大きく2つに分けられます。1) それぞれのパラメーターを独立した実験情報として取得する場合。2) 一方の実験情報パラメーターを他方のパラメーターが補正し、先の実験情報の精度を上げるために取得する場合（レシオメトリックな値）です。

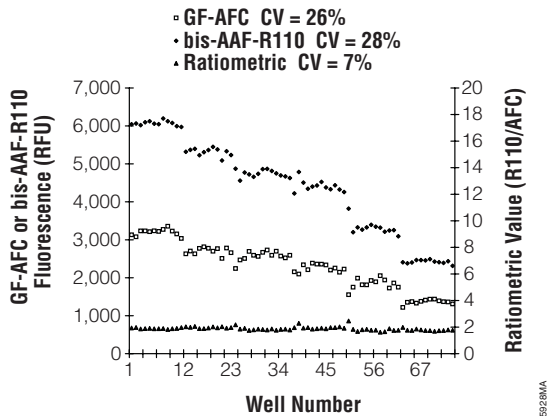
レシオメトリックな値は、レポーター実験で広く用いられているプロメガのDual-Luciferase® Assay Systemで得られる値が代表的で、トランスフェクション効率や細胞数によるばらつきを抑えた正確な値として実験データに信頼性を与えます。同様に精度の高い細胞毒性試験薬として新しくMultiTox-Fluor Assayが開発されています。

プロメガの各種セルベースアッセイシステムでは、アウトプットされるシグナルの違いなどを利用して同一サンプルまたは同一プレートから複数の情報を区別して収集することができます。Dual-Luciferase® Assayはホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼの異なる基質を利用することで2つの情報を連続的に得ることが出来ます。また、MultiTox-Fluor Assayでは蛍光波長の違いを利用して、細胞生存性と細胞毒性を同時に測定することができます。さらに、プロメガの複数のセルベースアッセイキットを組み合わせることでより多くの情報を獲得することができます（5ページ表参照）。サンプルの一部を特定のアッセイに使用し、残りのマスタープレートで他のアッセイやイメージング分析を行う方法もあります。



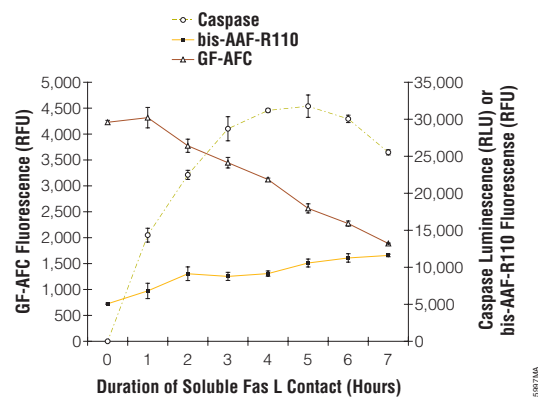
デュアルルシフェラーゼアッセイによるデータの正確性および情報量の増加

段階的に部分欠失したプロモーターの活性をホタルルシフェラーゼ活性として1日目、2日目に定量した（**パネルA**：ホタルルシフェラーゼ活性値、**パネルB**：ホタルルシフェラーゼ活性値をウミシイタケルシフェラーゼ活性値で補正）。**パネルC, D**：大腸菌およびファージのプロモーター（tacおよびT7）をそれぞれウミシイタケルシフェラーゼレポーターおよびホタルルシフェラーゼレポーターと組合せ、エタノールおよびリファンピシリンの影響を調べた。



レシオメトリックな値によるアッセイ精度の向上

Jurkat 細胞を半分に分け、片方を模擬的な細胞毒性を示す細胞群として調製するためにソニケーションを行った。もう片方と混和し、50%細胞生存性を示す細胞群とした。細胞の凝集による効果（細胞数のバラツキによる影響）を調べるために96ウェルプレートの各ウェルへ12,500個（ウェル1-12番）、11,000個（ウェル13-24番）、10,000個（ウェル25-36番）、9,000個（ウェル37-48番）、7,500個（ウェル49-60番）、5,000個（ウェル61-72番）となるように分注した（1ウェルあたり100μl）。MultiTox-Fluor Assay Reagentを等量添加し、37℃で30分間インキュベーションした。ウェル番号ごとに2種類の蛍光強度、または2つの蛍光強度の商（レシオメトリック値）をプロットした。



同一サンプルを用いたマルチアッセイ

Jurkat 細胞を1ウェルあたり培地 50μl に対して10,000個になるように播種し、37℃、5% CO₂で2時間平衡化した。培地で希釈したrhFasL (400ng/ml) 50μl を1時間毎に異なるウェルセットへ添加した（最長7時間）。20×のMultiTox-Fluor Reagent 10μl を添加し、旋回式シェーカーで混和した。その後、30分間インキュベーションを行い、蛍光を測定した。さらに、Caspase-Glo® 3/7 Reagent 100μl を添加し、10分間のインキュベーション後に発光を測定した。蛍光、発光ともBMG POLARstar plate readerを使用した。

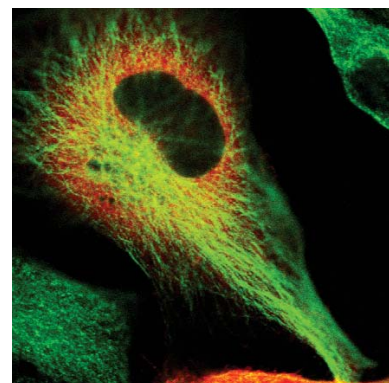
マルチアッセイの組合せ例とシグナルの分離技術

1st アッセイ	2nd アッセイ	シグナルの分離技術
細胞生存性および細胞毒性 (生プロテアーゼ) (死プロテアーゼ) MultiTox-Fluor™ Assay		波長 (505Em-520Em)
細胞生存性 (NADH) CellTiter-Blue® Assay	アポトーシス (カスパーゼ3/7) Apo-ONE® Caspase-3/7 Assay	波長 (590Em-530Em)
	アポトーシス (カスパーゼ3/7) Caspase-Glo™ 3/7 Assay	検出法 (蛍光-発光)
細胞毒性 (LDH) CytoTox-ONE™ Assay	細胞生存性 (ATP) CellTiter-Glo® Assay	検出法 (蛍光-発光)
	アポトーシス (カスパーゼ3/7) Caspase-Glo™ 3/7 Assay	検出法 (蛍光-発光)
	アポトーシス (カスパーゼ3/7) Apo-ONE® Caspase-3/7 Assay	波長 (590Em-530Em)
レポーターアッセイ (ウミシイタケルシフェラーゼ) EnduRen™ Live Cell Substrate	細胞生存性 (ATP) CellTiter-Glo® Assay	細胞状態 (生細胞-細胞溶解)
	アポトーシス (カスパーゼ3/7) Apo-ONE® Caspase-3/7 Assay	細胞状態 (生細胞-細胞溶解) 検出法 (発光-蛍光)
	アポトーシス (カスパーゼ3/7) Caspase-Glo™ 3/7 Assay	細胞状態 (生細胞-細胞溶解)
アポトーシス経路 (カスパーゼ8 or 9) Caspase-Glo® 8 または9 Assay	アポトーシス経路 (カスパーゼ3/7) Apo-ONE® Caspase-3/7 Assay	検出法 (発光-蛍光)
レポーターアッセイ (ホタルルシフェラーゼ) (ウミシイタケルシフェラーゼ) Dual-Glo™ または Dual-Luciferase Assay		基質 (ルシフェリン-セレンテラジン)
レポーターアッセイ (緑ルシフェラーゼ) (赤ルシフェラーゼ) Chroma-Glo™ Assay		波長 (537Em-613Em)

1st / 2nd アッセイ	3rd アッセイ	シグナルの分離技術
細胞生存性および細胞毒性 (生プロテアーゼ) (死プロテアーゼ) MultiTox-Fluor™ Assay	アポトーシス (カスパーゼ3/7) Caspase-Glo™ 3/7 Assay	検出法 (蛍光-発光)
	アポトーシス経路 (カスパーゼ8 or 9) Caspase-Glo™ 8 または9 Assay	検出法 (蛍光-発光)
	レポーターアッセイ (ホタルルシフェラーゼ) Bright-Glo™ Assay または Steady-Glo® Assay	検出法 (蛍光-発光)

■ ハイコンテンツなイメージング分析を可能にするHaloTag™ 技術

ハイコンテンツスクリーニングでは、蛍光色の違いを利用して複数の細胞内マーカーを同時に分析します。また、タンパク質の融合技術は、ハイコンテンツスクリーニングにおける標的タンパク質の研究を加速させました。新しいHaloTag™ タンパク質標識法の使用例として、NF-κBパスウェイのp65遺伝子を組み込み、HaloTag™ タンパク質との融合タンパク質を発現させ、この同じコンストラクト (HaloTag™ Vector + 標的タンパク質遺伝子) で細胞内のイメージングおよびタンパク質のin vitro解析を行うことができました。GFPと大きく異なる点はタンパク質へ標識する蛍光色を変更できることです。これによりタンパク質の運命の経時的な分析をベクターのコンストラクトを変えずに蛍光色を変更して実施することができます。また、色素とHaloTag™ は共有結合するため、変性条件下でも蛍光を維持させることができます。これはdsREDなど多くの蛍光タンパク質とは対照的な特長で、化学的に固定した細胞でのアプリケーションには重要です。これは細胞免疫染色とのマルチプレックス分析を可能にし、ハイコンテンツ分析を実現できます。さらに、色素の代わりにその他の機能を有する分子 (例えばビオチン) を利用したタンパク質相互作用の実験なども行えます (24ページ参照)。



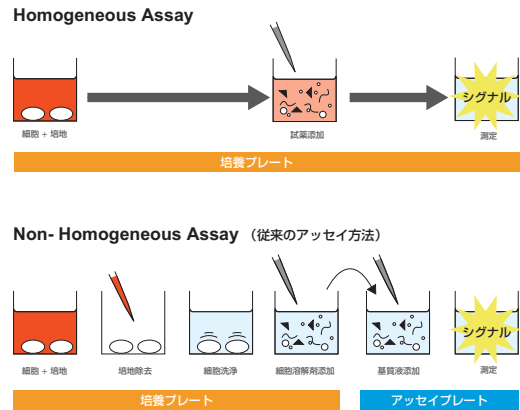
イントロダクション

ハイスループット分析 ～処理量の増加～

■ ホモジニアスアッセイ & 長時間発光（ハイスループットアッセイ）

アッセイ数をより多くしかも短時間で処理することは多検体処理を行う上で重要です。ホモジニアスアッセイは、近年のリアクションボリュームの微細化にともなうマルチウェルを用いた多検体処理に対応するために、アッセイ操作をよりシンプルにする方法です。サンプルや試薬の移動/分注回数を最低限に抑えたアッセイを行うことで、操作時間・労力の削減、プレートやピペットチップの節約が実現できます。特に、細胞を用いたアッセイ系では、培地の除去・洗浄、細胞の溶解など、複数の工程を要するため、多検体を一度に処理する場合は非常に煩雑で時間のかかる操作でした。プロメガのセルベースアッセイ試薬の標準的なプロトコルは、“添加 → 混和 → 測定”です。培地に含まれる成分（血清やフェノールレッドなど）により、検出反応やシグナルに影響を受けにくい工夫がなされているため、培地の除去が不要です。また、細胞内のマーカーを検出する試薬は、シグナルを得るための基質供給と細胞溶解の2つの働きを持つため、試薬の分注回数を低減できます。これらの特長は、アッセイの自動化を容易にし、ハイスループットスクリーニングを実現します。また、ルシフェラーゼ発光を利用するアッセイでは、発光持続時間が短いと、マルチウェルプレートでの処理ではウェルごとに試薬の分注と測定を素早く繰り返す必要があるためインジェクターを必要とし、処

理時間も長くなります。プロメガでは独自の技術により発光時間を延長させたGlo シリーズのアッセイ試薬を多数開発しています。

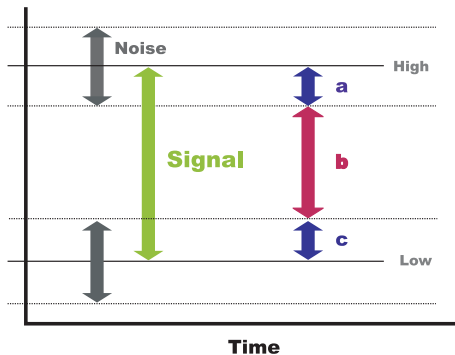


ホモジニアスアッセイと従来法の違い（細胞内の酵素をアッセイする場合）

■ アッセイ法の優秀性を示す Z' Factor

データの有効性および再現性からそのアッセイ法を評価する指標として“Z'-factor”と呼ばれる統計的なパラメーターが使用されています。シグナル域（またはダイナミックレスポンスレンジ）および、シグナルの高域、低域で発生するノイズから算出されるこの「スクリーニングウィンドウ係数」は、“1”に近づくほど

優れています。通常、推奨される“Z'-factor”レンジは0.5 < Z < 1です（下表参照）。一般的にアッセイ法を選択する際に感度を最優先的に求める傾向がありますが、むしろノイズの少ないアッセイ法が、有効なダイナミックレンジの広い優れたアッセイ系であるといえます。



$$Z' = \frac{b}{a + b + c}$$

Biomek® 2000 および FX プラットフォームを用いた各自動化セルベースアッセイの Z'-Factor

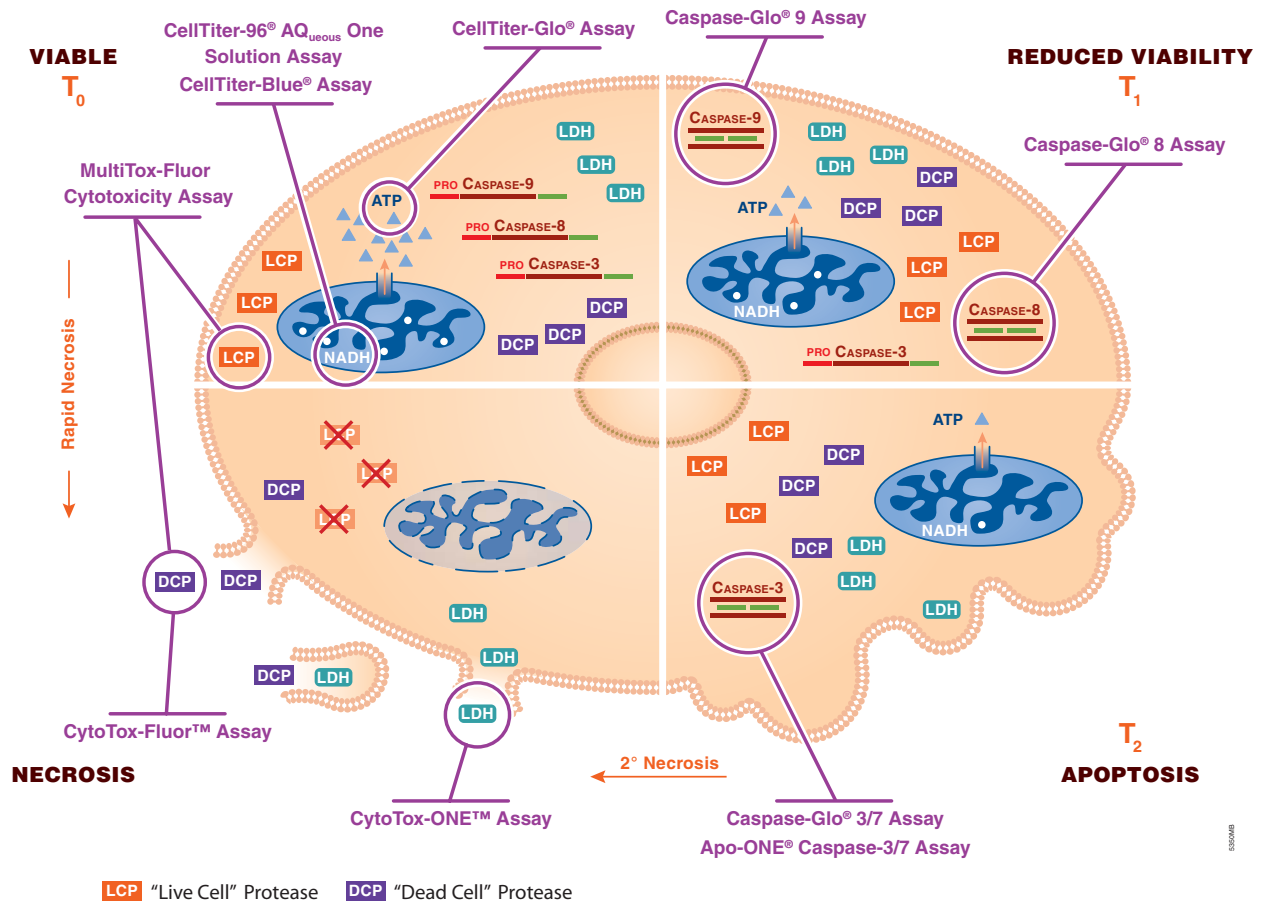
アッセイ	プラットフォーム	ウェルフォーマット	Z'-Factor
Apo-ONE®	Biomek® 2000	96	0.80
Homogeneous		384	0.58
Caspase-3/7	Biomek® FX	96	0.77
Assay		384	0.76
CellTiter-Glo®	Biomek® 2000	96	0.76
Luminescent		384	0.61
Cell Viability	Biomek® FX	96	0.80
Assay		384	0.70
Caspase-Glo® 3/7	Biomek® 2000	96	0.63
Assay		384	0.62
	Biomek® FX	96	0.90
		384	0.84
CellTiter-Blue®	Biomek® 2000	96	0.88
Cell Viability		384	0.70
Assay	Biomek® FX	96	0.90
		384	0.77
CytoTox-ONE™	Biomek® 2000	96	0.56
Homogeneous		384	0.68
Membrane	Biomek® FX	96	0.68
Integrity Assay		384	0.61

※ 表示の値は特定の分注装置を用いた場合の例です。詳細については www.promega.com/pnotes/85/10904_25/10904_25.pdf をご覧ください。

Z' factor	説明	スクリーニング適正
1	標準偏差=0、ダイナミックレンジ=∞	理想的
0.5~1	広い分離帯	優秀
0~0.5	狭い分離帯	可~良
0	高・低のノイズ域が接合	Yes/Noのみの分離
<0	分離帯なし	分離不可

細胞内在性マーカーの定量（細胞状態の同定）

細胞内に存在するマーカーを測定し、細胞の状態を観察。



■ 細胞生存/毒性試験の選び方

in vitro 生存/毒性試験を選ぶ場合、生細胞（生存性）を測定するのか、あるいは死細胞（毒性）を測定するかを決定し、細胞死のメカニズムまで調べる場合は、アポトーシスまたはネクローシスについて考慮します。さらに、利用するモデルシステム（細胞・密度）、必要な感度、利用できる機器および制限、マルチアッセイの必要性、標的化合物のアッセイに対する潜在的な影響、簡便性なども検討すべきポイントです。

アッセイから求める情報が単純に“未処理（ネガティブコントロール用ウェル）”と“毒性処理（実験用ウェル）”間の違いである場合、生細胞または死細胞のどちらの数を測定してもかまいません。しかし、細胞死メカニズムのより詳細な情報が必要である場合は、毒物への暴露時間、テスト化合物の濃度、測定するエンドポイントの選択などが重要になります。

細胞死の異なるメカニズムで起こる変化を基本的に理解することは、細胞毒性試験で選ぶべきエンドポイントを決定する場合に役立ちます。in vitro でアポトーシスを起こしている細胞は、最終的に

は二次的なネクローシスを起こすこととなります。インキュベーションを延長した後、アポトーシス細胞はついに代謝機能を停止し、細胞膜の完全性が失われ、細胞質の内容物が培地に漏出されます。カスパーゼ活性などのアポトーシスのマーカーは、一時的に発現するだけであるため、アポトーシスが細胞死の主要なメカニズムであることを確認し、利用するモデルシステムが持つ細胞死プロセスの流れを理解することが必須です。通常、ネクローシスを起こしている細胞は、急激に肥大化し、細胞膜の完全性が失われ、代謝機能が停止し、細胞質の内容物が周囲の培地に漏出します。In vitro で細胞が急速にネクローシスを起こす場合、アポトーシス機構を活性化する十分な時間とエネルギーがないため、アポトーシスマーカーを発現しません。プロメガのセルベースアッセイを組み合わせ、各種マーカーを適切に測定することにより、細胞死の状態を区別することが可能になります。

※ アポトーシスアッセイのタイミングについては www.promega.com/cnotes/cn016/cn016_18.pdf もご参照下さい。

細胞状態の同定

■ 細胞内マーカー定量リスト

	プロテアーゼ		呼吸系 エネルギー合成能	
	MultiTox-Fluor Assay (細胞毒性も同時測定：下表)	CellTiter-Glo® Assay	CellTiter-Blue® Assay	CellTiter 96® AQueous One Solution Assay
標的分子	"Live Cell" Protease	ATP	NADH	NADH
検出	蛍光 (400Ex/505Em)	発光	蛍光 (560Ex/590Em) / 発色 (570nm)	発色 (490nm)
感度*	◎ (約40個)	◎ (<10個)	◎** (約50個)	◎ (約200個)
検出までの所要時間	0.5~3時間	約10分間	1~4時間	1~4時間
1ショットタイプ	○	○	○	○
シグナルの安定性	—	5時間以上	24時間以内***	18時間以内***
原理	生細胞由来のプロテアーゼによるGF-AFC基質の切断に伴い生じる蛍光として測定。本プロテアーゼは細胞膜が壊れ、培地中に漏出すると不活性化	生細胞由来のATPを、ルシフェラーゼ反応により生じる発光として測定	各種還元酵素によるレザズリンの還元により生成するレゾルフィンの蛍光および発色として測定	NADHによるPMSを介したMTSの還元により生じるホルマゼン産物を測定

	細胞膜の損傷		
	MultiTox-Fluor Assay (細胞生存性も同時測定：上表)	CytoTox-Fluor™ Assay	CytoTox-ONE™ Assay
標的分子	"Dead Cell" Protease	"Dead Cell" Protease	LDH
検出	蛍光 (485Ex/520Em)	蛍光 (400Ex/505Em)	蛍光 (560Ex/590Em)
感度*	◎ (約10個)	◎ (約10個)	◎ (約200個)
検出までの所要時間	0.5~3時間	0.5~3時間	約10分間
1ショットタイプ	○	○	○
シグナルの安定性	—	—	2日****
原理	細胞から漏出した死細胞由来のプロテアーゼによるbis-AAF-R110基質の切断に伴い生じる蛍光として測定 (本基質は細胞内へ透過しない)	細胞から漏出した死細胞由来のプロテアーゼによるbis-AAF-R110基質の切断に伴い生じる蛍光として測定 (本基質は細胞内へ透過しない)	漏出LDHをレザズリン/ジアホル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測定

	カスパーゼの活性化			
	Caspase-Glo® 3/7 Assay	Caspase-Glo® 8 Assay	Caspase-Glo® 9 Assay	Apo-ONE® Caspase -3/7 Assay
標的分子	Caspase-3/7	Caspase-8	Caspase-9	Caspase-3/7
検出	発光	発光	発光	蛍光 (485Ex/530Em)
感度*	◎ (約20個)	○ (約1000個)	○ (約1500個)	◎ (約200個)
検出までの所要時間	0.5~2時間	0.5~2時間	0.5~2時間	1~18時間
1ショットタイプ	○	○	○	○
シグナルの安定性	4時間以上	2時間以上	2時間以上	—
原理	カスパーゼ3/7によるZ-DEVD-ルシフェリンの切断により生じる発光を測定	カスパーゼ8によるZ-LETD-ルシフェリンの切断により生じる発光を測定	カスパーゼ9によるZ-LEHD-ルシフェリンの切断により生じる発光を測定	カスパーゼ3/7によるZ-DEVD-ローダミン110の切断により生じる蛍光を測定

* 感度は細胞のタイプや実験条件により異なります。表示されている細胞数は目安としてお考え下さい。

** 蛍光検出の場合

*** Stop Solutionを添加した場合

**** Stop Solutionを添加し、培地に血清が含まれている場合 (血清が含まれていない場合は1~2時間)

※ セルベースアッセイの選択については www.promega.co.jp/jp/promotec_J/pdf/pj12/PJ-No12-01.pdf もご参照下さい。

蛍光

MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay **NEW**

細胞毒性 & 生存試験 (“死細胞”, “生細胞” プロテアーゼ)

MultiTox-Fluor Multiplexed Cytotoxicity Assayは1液タイプのホモジニアス蛍光アッセイシステムで、培養細胞における生細胞および死細胞を同時に測定することができます。生細胞由来プロテアーゼ活性は、インタクトな生存細胞内に限定され、細胞透過性のペプチド基質を利用した蛍光法により測定されます(400Ex/505Em)。この基質は生存細胞に透過し、プロテアーゼに切断されて生細胞の数に比例した蛍光シグナルを生じます。この生細胞由来プロテアーゼ活性マーカーは細胞膜の完全性が失われると不活性化して培地中に漏出します。2つめの細胞非透過性蛍光ペプチド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の測定に使用されます(485Ex/520Em)。従来法との相関性については15ページのグラフをご覧ください。

同じウェル内で生細胞と死細胞を同時に測定

1液タイプのホモジニアスアッセイなので“添加-混和-測定”を行うだけのシンプルな操作が可能

内部標準によるデータ補正

生細胞数と死細胞数の比率は、細胞数に依存しない補正されたデータであるため、ウェル間、プレート間、測定日間での比較が容易

擬陽性/擬陰性を低減

互いに異なる化学反応を利用しているため、生細胞および死細胞の測定は互いに補完的に機能(片方がテスト化合物に阻害されても、もう片方が内部標準となる)。

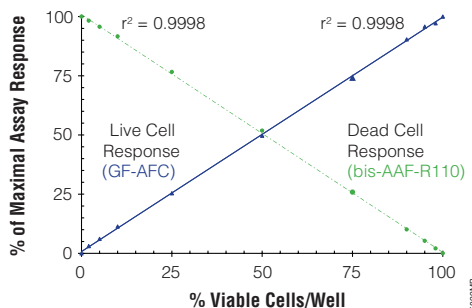
各ウェルからより多くのデータを取得

多くの生物発光セルベースアッセイ(アポトーシスアッセイ、レポーターアッセイ、プロテアーゼアッセイ)とのマルチアッセイが可能

アッセイのバラツキを低減

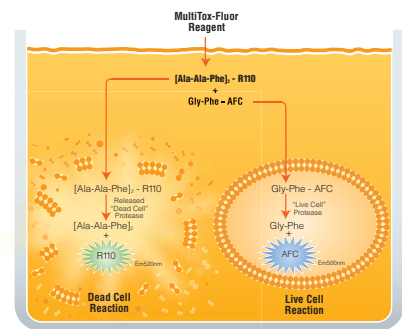
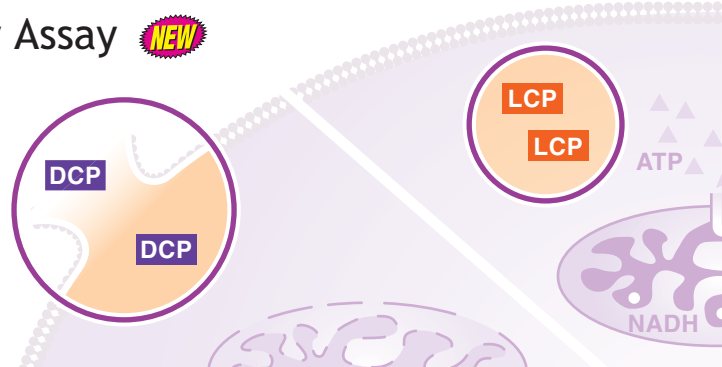
ホモジニアスな“添加-混和-測定”によるシンプルなプロトコルは、ステップ数の多いプロトコルによるエラーの蓄積を回避

保存条件: -20℃



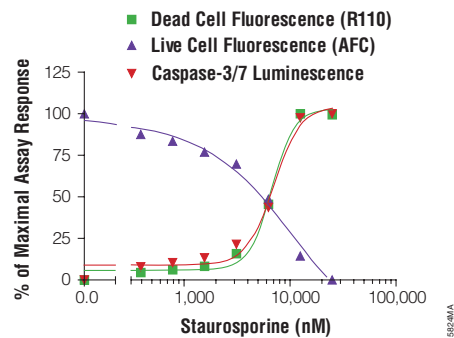
MultiTox-Fluor Assayにより得られたレシオメトリック応答

生存性が高い場合、生細胞シグナルは最大になり、死細胞シグナルは最も低くなる。生存性が低い場合、生細胞シグナルは最低になり、死細胞シグナルは最大になる。実線が生細胞シグナル。点線が死細胞シグナル



MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assayの測定原理

GF-AFC Substrateは生細胞内に透過し、“生細胞”プロテアーゼにより切断され、AFCを遊離。Bis-AAF-R110 Substrateは細胞膜を透過できず、細胞死により漏出した“死細胞”プロテアーゼにより切断されてR110を遊離。



カスパーゼ3/7アッセイとのマルチプレックス

LN-18細胞を1ウェル(培地50μl)あたり10,000個の密度で播種し、一昼夜培養後、スタウロスポリンを2段階階希釈系列で1ウェルあたり50μl添加した。37℃、6時間インキュベーション後、MultiTox-Fluor Reagentを10μl添加し混和した後、30分間インキュベーションした。蛍光測定後、Caspase-Glo® 3/7 Reagent 100μl添加し、10分後に発光測定した。

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay	10ml	G9200	27,000
	5×10ml	G9201	76,000
	2×50ml	G9202	140,000

- ・ 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。
- ・ パ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/multitox.html

Protocol No.

TB348

発光

CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay

細胞生存試験 (ATP)

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ッ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測定システムに較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較べ優れた感度 (細胞10個 [384プレート]、細胞50個 [96プレート] を検出)。

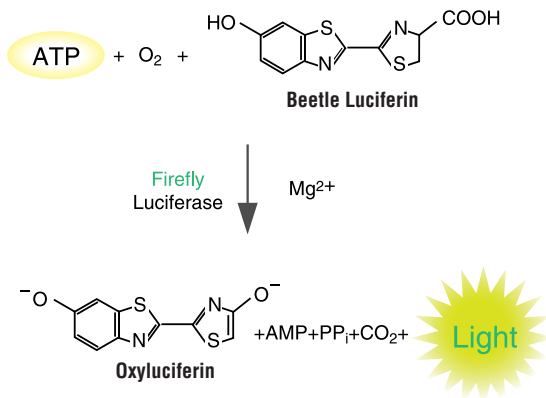
安定性

発光が非常に安定 (5時間以上)。

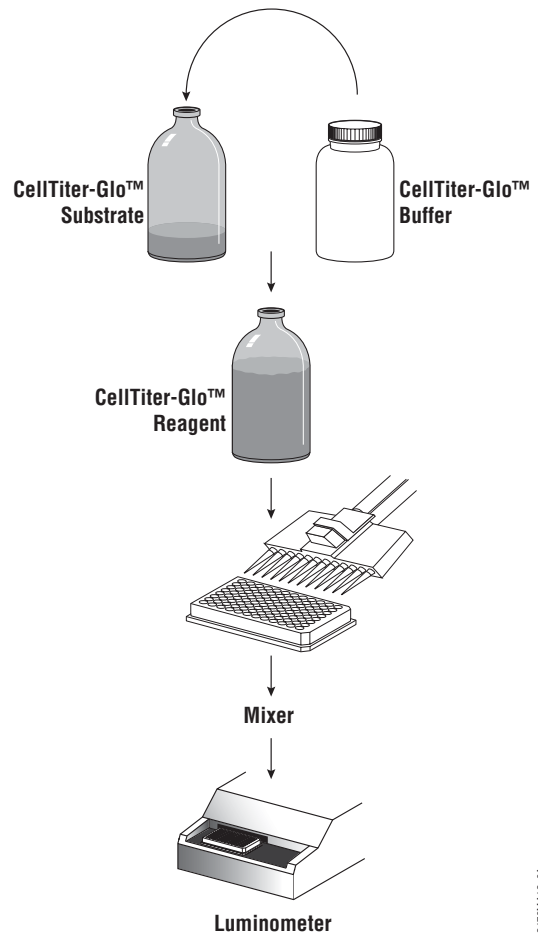
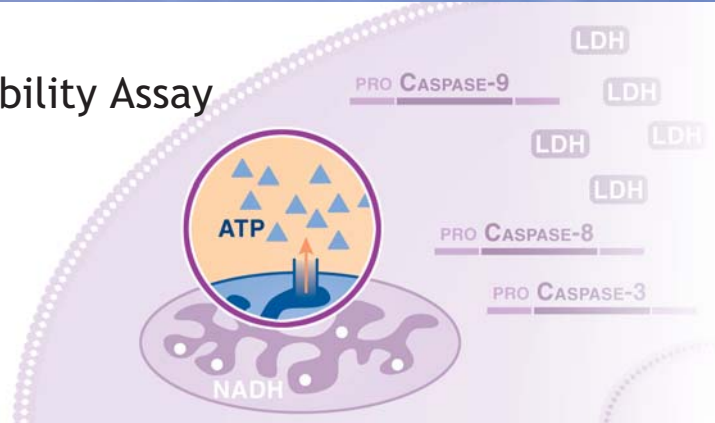
応用性

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。

保存条件: -20℃ (長期保存)

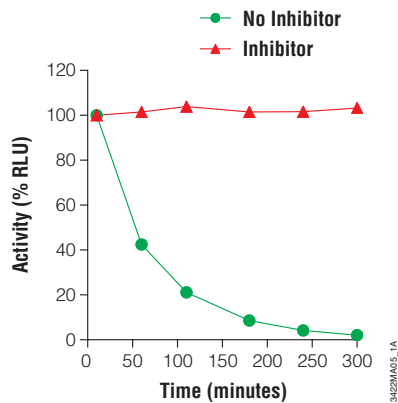


CellTiter-Glo® Assayの測定原理



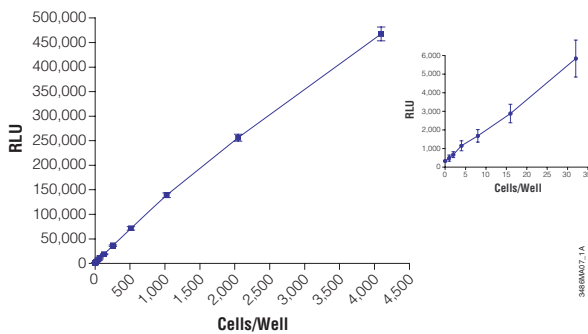
CellTiter-Glo® Assayの操作概要

3170MAT2_0A



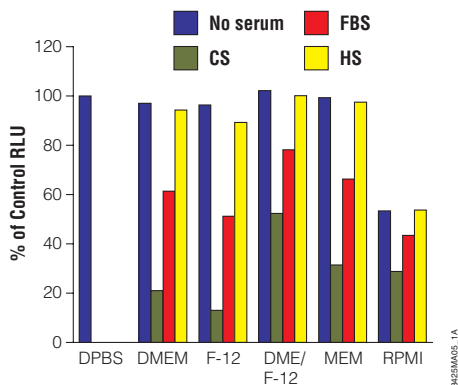
CellTiter-Glo® ReagentによるATPase活性の阻害

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℃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、もう一方には等量の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。



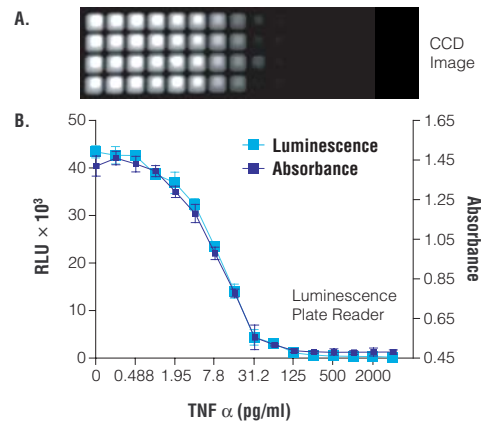
細胞数と発光量の相関関係

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。

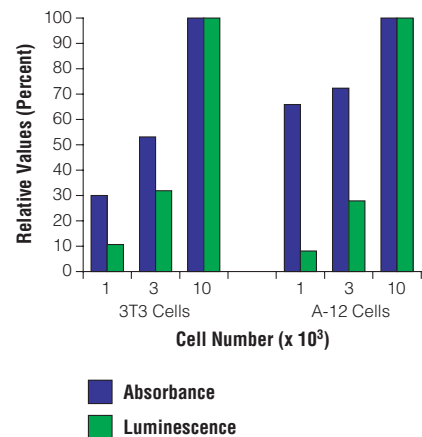


培地への血清添加がルシフェラーゼ反応に及ぼす影響

CS: 仔ウシ血清、HS: ウマ血清、FBS: ウシ胎児血清。



CellTiter-Glo® AssayとCellTiter 96® Aqueous One Solution Assay (MTS法) を用いてL929細胞に対するTNF α の細胞毒性を384ウェルプレートで測定



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に計算した。

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
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/celltitglo.html

Protocol No.

TB288

蛍光

CellTiter-Blue® Cell Viability Assay

細胞生存試験 (NADH)

CellTiter-Blue® Cell Viability Assayは、細胞の生存をモニタリングするための蛍光ホモジニアスアッセイフォーマットの試薬です。このアッセイ法の基本原理は、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の簡便性を併せ持ちます。インキュベーション後、プレート用の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。

ホモジニアス

ホモジニアスフォーマット (試薬添加→インキュベート→測定) により手作業が削減されます。

優れた感度とZ' factor

高純度レサズリンを使用しているため高い感度とZ'を実現。

2つの検出法

蛍光または発色による検出が可能。

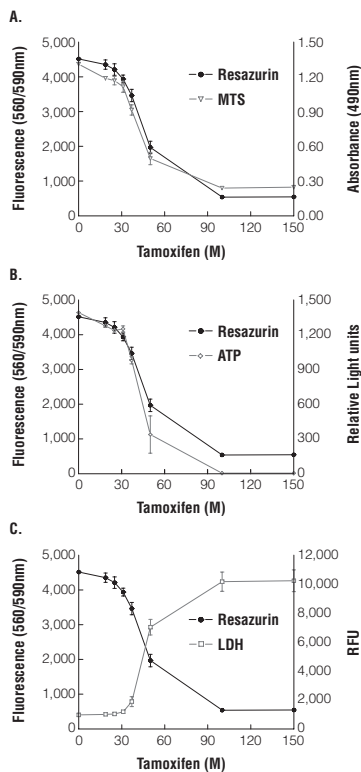
マルチアッセイ

Apo-ONE® Assay (アポトーシス検出) などとの併用によるマルチプレックスアッセイが可能。

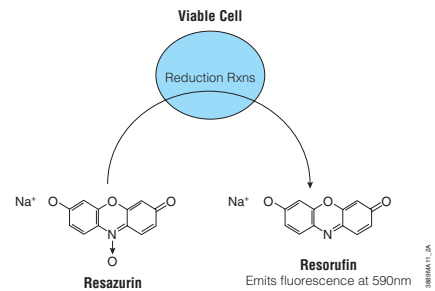
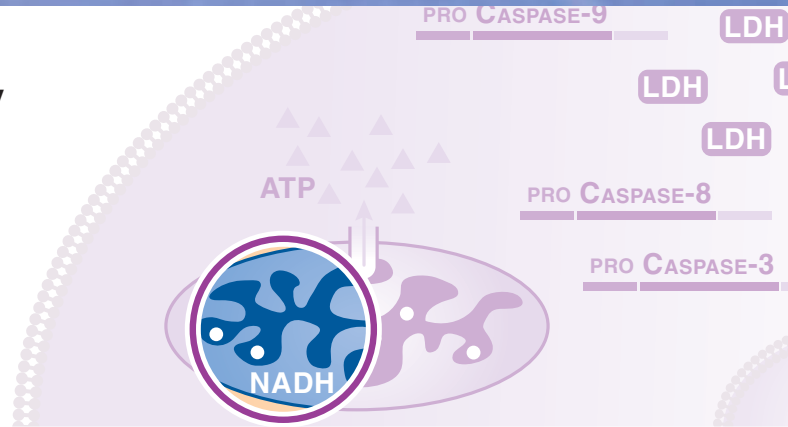
処理量に合わせて

96または384ウェルフォーマットに十分な試薬を供給し、ハイスループットスクリーニングに適したサイズも用意。

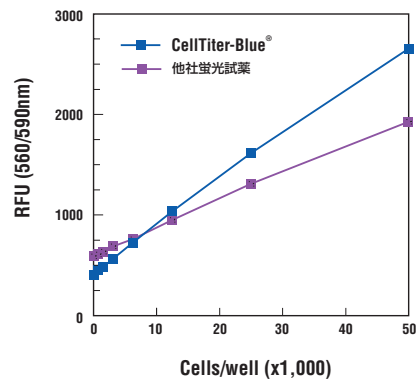
保存条件: -20℃ (遮光)



各種細胞毒性テストとの比較



CellTiter-Blue®の測定原理



CellTiter-Blue®と他社製品との感度の比較

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	20 ml	G8080	16,000
	100 ml	G8081	45,000
	10X100 ml	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4000ウェル分。
 ・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/celltitblue.html

Protocol No.

TB317

発色

CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay

細胞生存試験 (NADH)

CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assayは、細胞生存試験や細胞毒性試験における生細胞数を測定する発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、便利な単一溶液として利用できます。さらに、MTSホルマザン産物の可溶化が不要なため他のMTTやINTのようなテトラゾリウム化合物に比べ作業行程を短縮することができます。アッセイ操作では、培養ウェルに少量のCellTiter 96® AQueous One Solution Reagentを直接添加して、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、培地に可溶な有色のホルマザン産物に変換されます。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のホルマザン定量値が、培地中の生細胞数に比例します。

ホモジニアス

単一溶液なので、ホモジニアスアッセイ（試薬添加→インキュベーション→測定）が行えます。

迅速

蛍光または発色による検出が可能。細胞の洗浄および回収が不要であり、MTTアッセイで要求される可溶化処理も不要です。

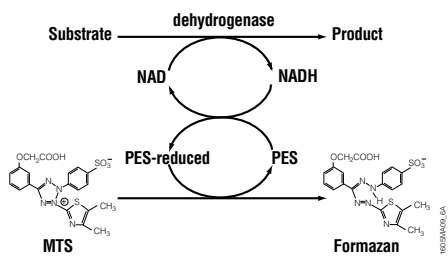
安全

シンチレーションカクテルや放射性廃棄物の処理が不要で、MTTでは必要な揮発性の有機溶媒も使いません。

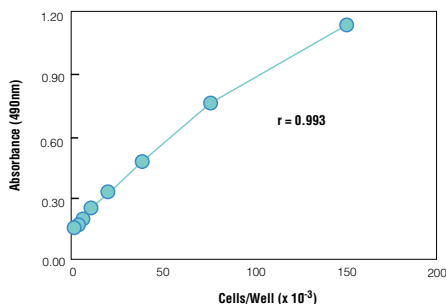
柔軟性

測定後のプレートをインキュベーターに戻せば、発色反応を続けることができます。

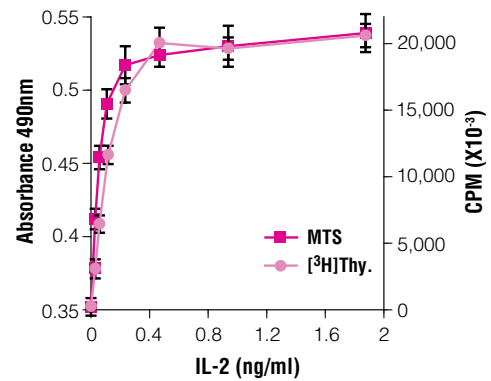
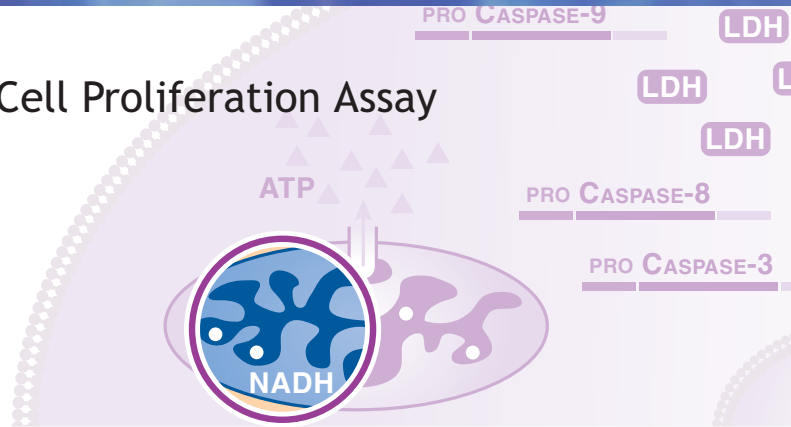
保存条件：-20℃（長期保存、遮光）



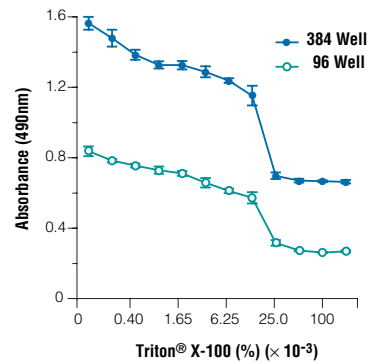
CellTiter 96® AQueous One Solution Assayの測定原理



CellTiter 96® AQueous One Solution Assayを用いて測定した490 nm吸光度と細胞数との関係



CellTiter 96® AQueous One Solution AssayとRI法の相関性



96または384ウェルプレートフォーマットでの細胞毒性テスト

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	200回分	G3582	6,000
	1000回分	G3580	22,000
	5000回分	G3581	72,000

・表示の回数は96ウェルプレートの場合です。
 ・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

Protocol No.

TB245

蛍光

CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay

細胞毒性試験 (LDH)

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された乳酸脱水素酵素(LDH)を、レザズリン/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、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。

迅速

試薬添加から測定開始まで10分。

ホモジニアス

培地を含む細胞に1つの試薬を加えるだけ。

LDHの検出

安定性が高く、実績の多い細胞毒性マーカーLDHを検出。

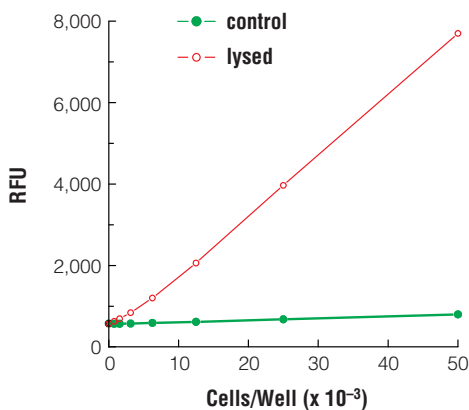
便利

サンプルを別プレートに移して測定する必要がありません。

順応性

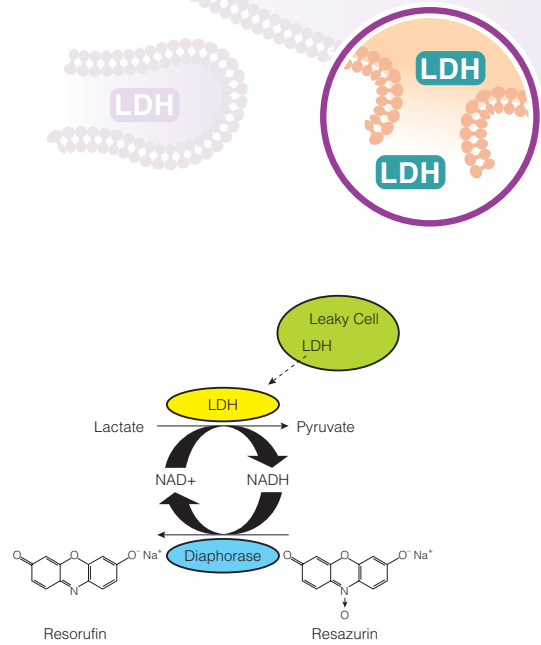
Stop Solution を加えれば、シグナルは数時間安定。

保存条件: -20℃ (避光)

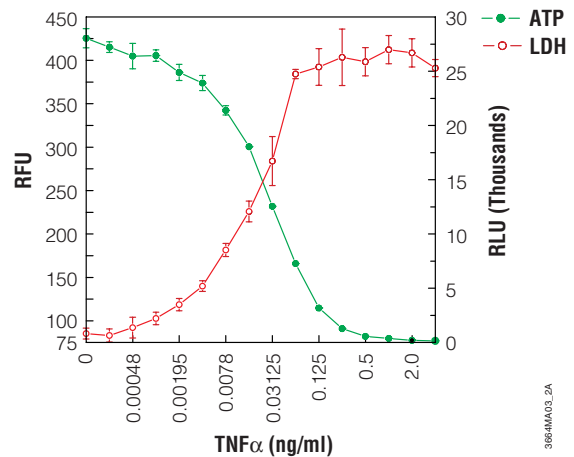


細胞数と蛍光強度における直線性

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-ONE™の測定原理



TNFα 処理 L929 細胞の CytoTox-ONE™ (LDH) を用いた毒性試験と CellTiter-Glo™ を用いた ATP アッセイ

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay	200回分	G7890	16,000
	1000回分	G7891	49,000

・表示の回数は96ウェルプレートの場合です。(384ウェルプレートの場合は4倍の回数に相当)。
・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/liit/cytotoxone.html

Protocol No.

TB306

蛍光

CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay **NEW**

細胞毒性試験 (“死細胞” プロテアーゼ)

DCP

CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assayは、1液タイプのホモジニアス蛍光アッセイシステムで、細胞集団に存在する死細胞を測定するために使用します。本製品は細胞毒性に関連する特定のプロテアーゼ活性を測定し、細胞膜の完全性が失われた場合に放出される“死細胞活性”を測定するために蛍光を生じるペプチド基質 (bis-alanyl-phenylalanyl-rhodamine 110; bis-AAF-R110) を利用します(485Ex/520Em)。この bis-AAF-R110 substrate は生細胞のインтактな細胞膜は透過しないため、生細胞ではシグナルを生じません。このアッセイは、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。

死細胞を測定

1種類の試薬を加えるだけのホモジニアスな“添加-混和-測定”フォーマット

各ウェルからより多くのデータを取得

多くの生物発光セルベースアッセイとのマルチアッセイが可能

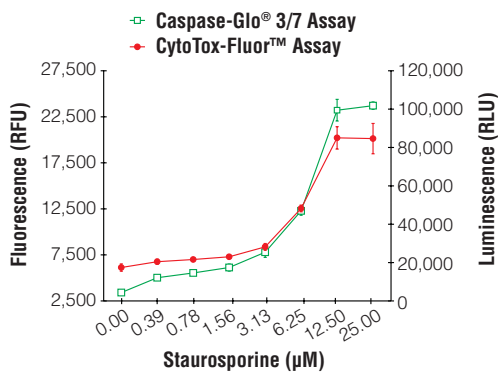
後で取得するマルチアッセイの結果を細胞毒性について補正

死細胞数で補正したデータはウェル間、プレート間、測定日間で結果の比較が可能

アッセイのバラツキを低減

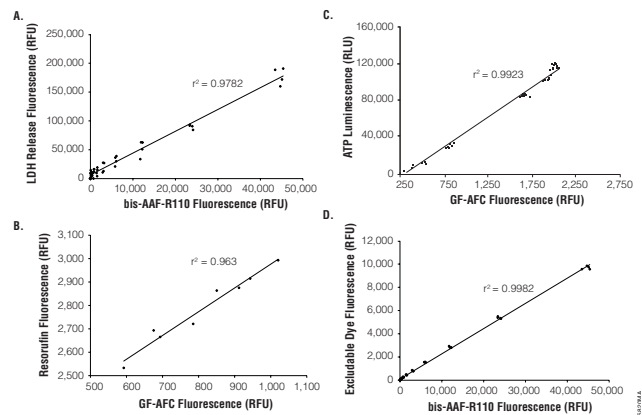
ホモジニアスな“添加-混和-測定”によるシンプルなプロトコルは、ステップ数の多いプロトコルによるエラーの蓄積を回避

保存条件：-20℃



カスパーゼ3/7アッセイとのマルチプレックス

CytoTox-Fluor™ Assay Reagentを各ウェルに添加し、37℃、30分間のインキュベーション後に細胞毒性試験を行った。その後、Caspase-Glo® 3/7 Reagentを添加し30分間のインキュベーション後に発光を測定した。



従来法との相関性

パネルA. bis-AAF-R110基質とCytoTox-ONE™ Assay (LDH検出) で測定し、その相対値をプロットした。パネルB. GF-AFC基質とCellTiter-Blue® Assay (還元能検出) で測定し、その相対値をプロットした。パネルC. GF-AFC基質とCellTiter-Glo® Assay (ATP検出) で測定し、その相対値をプロットした。パネルD. bis-AAF-R110基質とエチジウム ホモダイマー (色素排出試験) で測定し、その相対値をプロットした。
※GF-AFC基質については9ページをご覧ください。

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay	1 × 10ml	G9260	15,000
	5 × 10ml	G9261	61,000
	2 × 50ml	G9262	94,000

- ・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合せください。

プロメガ資料

www.promega.co.jp/lit/cytotoxfluor.html

Protocol No.

TB350

アポトーシスアッセイ

発光

Caspase-Glo® 3/7, 8, 9 Assays

カスパーゼ 3/7, 8, 9 アッセイ

本製品は、カスパーゼ3/7および8, 9活性を測定するためのホモジニアスフォーマットを採用した発光検出によるアッセイシステムです。カスパーゼ活性、ルシフェラーゼ活性、細胞溶解の全てに最適化された各試薬には、それぞれDEVD, LETD, LEHD配列を持つルシフェリン基質が含まれています。各システムに含まれるこの1種類のCaspase-Glo® Reagentを加えれば、細胞溶解、カスパーゼによる基質の切断、ルシフェラーゼ存在下でのグロタイプ発光シグナルの生成が連続的に起こり、“添加-混和-測定”のシンプルな測定が行えます。生じた発光は各カスパーゼ活性に比例します。このアッセイでは、特許を持つ安定化されたルシフェラーゼに加え、特殊なバッファースystemを採用しています。このバッファースystemにより、広範なアッセイ条件下でのパフォーマンスが向上し、他の発光/蛍光/発色をベースとしたアッセイに比べ、化合物による影響が受けにくくなっています。Caspase-Glo® Assayは、精製した酵素や培養細胞を用いたマルチウェルプレートフォーマットに合わせてデザインされています。

高い感度とS/N比

発光法によるアッセイなので、感度に優れ、蛍光法で問題となる化合物固有の蛍光による影響がなく、優れたS/N比を実現。

ホモジニアス

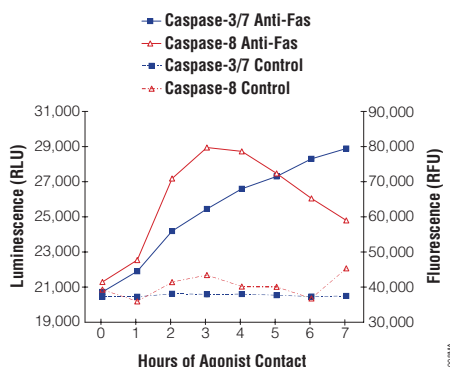
シンプルな“添加-混和-測定”プロトコルにより、自動化が容易(サンプルと等量の試薬を1種類加えるのみ)。

迅速

通常、1時間以内に最大感度が得られるため、蛍光法のような長時間のインキュベーションが不要。

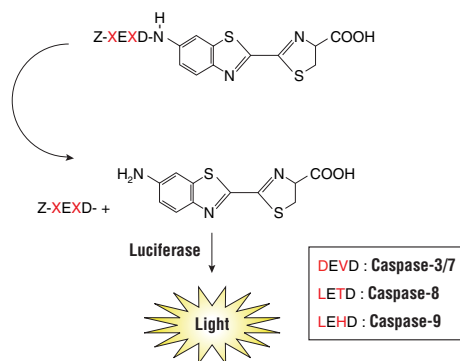
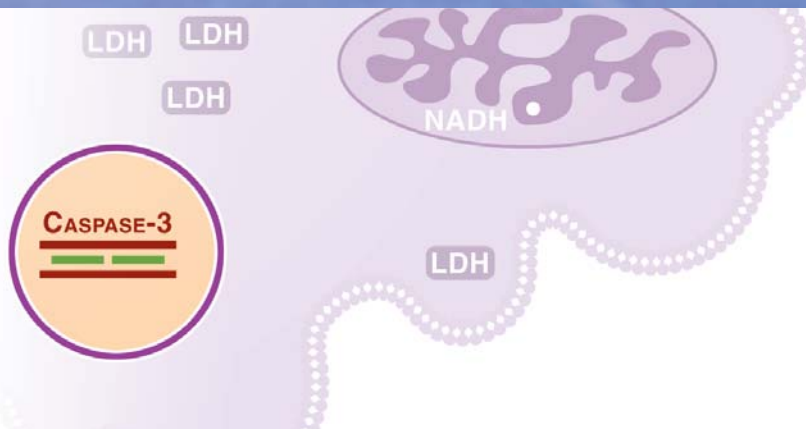
長時間発光

3時間安定なグロタイプのシグナルによりバッチ法によるプレート処理も可能。



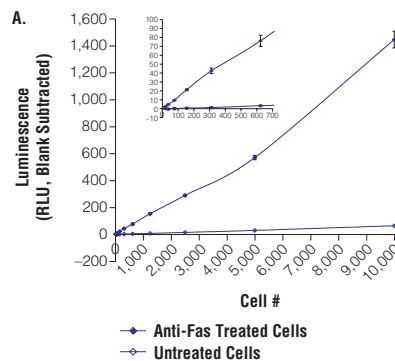
時間の経過ともなうカスパーゼ-8およびカスパーゼ-3/7の活性化

Jurkat 細胞を1ウェルあたり25,000個播種し、anti-Fas mAbまたはビーグルを1時間ごとに7時間後まで添加した。カスパーゼ-8はCaspase-Glo® 8 Assay (発光基質 Z-LETD-aminoluciferin) を用いて測定し、カスパーゼ-3/7はApo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay (発光基質 [Z-DEVD]₂-R110) の変法を用いて測定した。室温で1時間インキュベーションした後、同一ウェルから発光と蛍光を測定した。



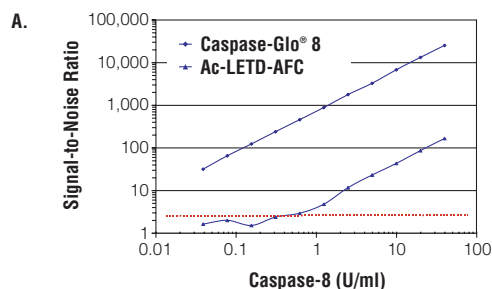
各カスパーゼの標的配列を持つ発光用基質

カスパーゼ活性によりホタルルシフェラーゼの基質(アミノ-ルシフェリン)が遊離し、ルシフェラーゼ反応で利用されて発光する。



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。



Caspase-Glo® 8 AssayとAFC基質を用いた従来法との比較

リコンビナントカスパーゼ-8を10mM HEPES, pH 7.5, 0.1%Prionexで2倍段階希釈し、Caspase-Glo® 8 ReagentおよびAc-LETD-AFC基質はDTTを添加したCaspase-Glo® Bufferで希釈した。各ウェルにサンプルと試薬を等量添加し、1時間後に発光または蛍光シグナルを測定した。点線は検出限界を示す。

製品案内

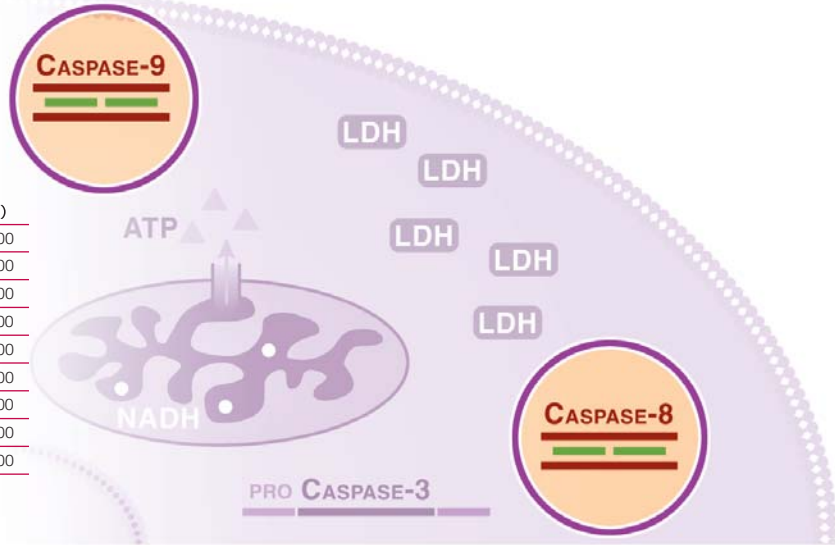
製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Caspase-Glo® 3/7 Assay	2.5ml	G8090	17,500
	10ml	G8091	66,000
	100ml	G8092	319,000
Caspase-Glo® 8 Assay	2.5ml	G8200	17,500
	10ml	G8201	66,000
	100ml	G8202	319,000
Caspase-Glo® 9 Assay	2.5ml	G8210	17,500
	10ml	G8211	66,000
	100ml	G8212	319,000

・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合せください。

プロメガ資料

www.promega.co.jp/lit/caspglo.html
www.promega.co.jp/lit/caspglo8.html
www.promega.co.jp/lit/caspglo9.html

Protocol No. TB323, TB332, TB333

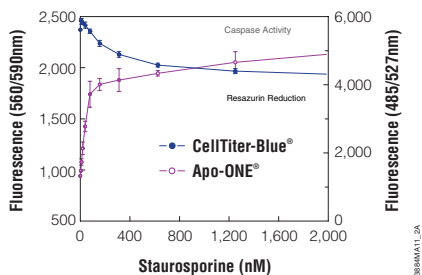


※ アポトーシス細胞のイメージングについては27ページをご覧ください。

蛍光

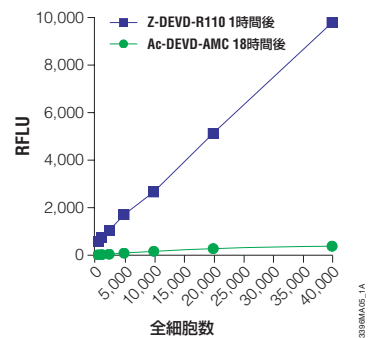
Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay カスパーゼ3/7 アッセイ

本製品はカスパーゼ3/7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。定量を行うには、まず基質をバッファーで溶解し、この試薬を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トを行った後、蛍光プレートリーダーで測定します(498Ex/521Em)。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。蛍光産物量はサンプルに存在するカスパーゼ3/7活性量に比例します。カスパーゼ3/7定量には精製酵素や細胞抽出液、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。



同一プレートを用いたマルチアッセイ

Jurkat細胞を様々な濃度のスタウロスポリンで処理した。薬剤添加後すぐにCellTiter-Blue® Reagentを加え、5時間インキュベートした後、蛍光を測定した(560nmEx/590nmEm)。カスパーゼ3/7活性は同じプレートを用いてApo-ONE® Assayにより測定した(485nmEx/527nmEm)。



Apo-ONE® AssayとAMC基質を用いた測定法との感度比較

Jurkat細胞は96ウェルプレートに段階希釈し、anti-Fas抗体で5時間処理し、アポトーシスを誘導した。

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay	1ml	G7792	6,000
	10ml	G7790	58,000
	100ml	G7791	280,000

・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/apoone.html

Protocol No.

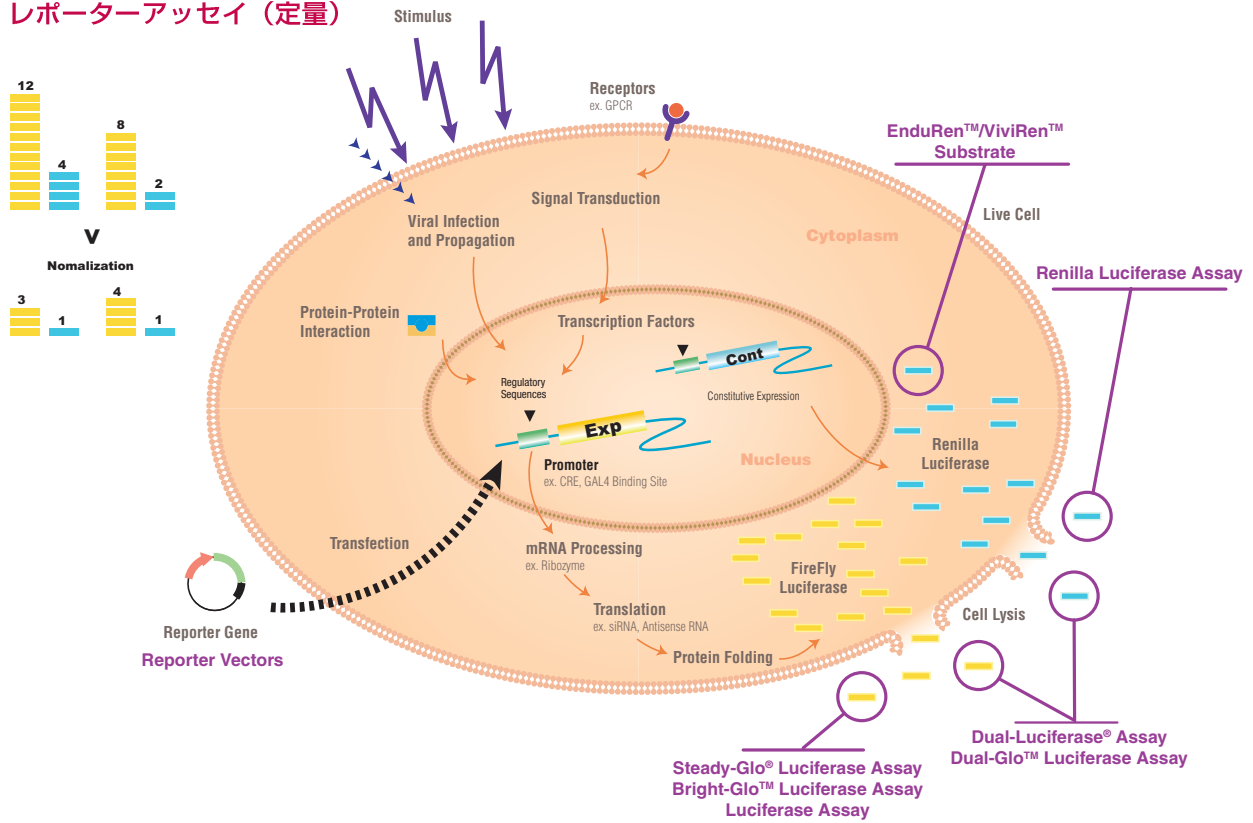
TB295

レポーター解析

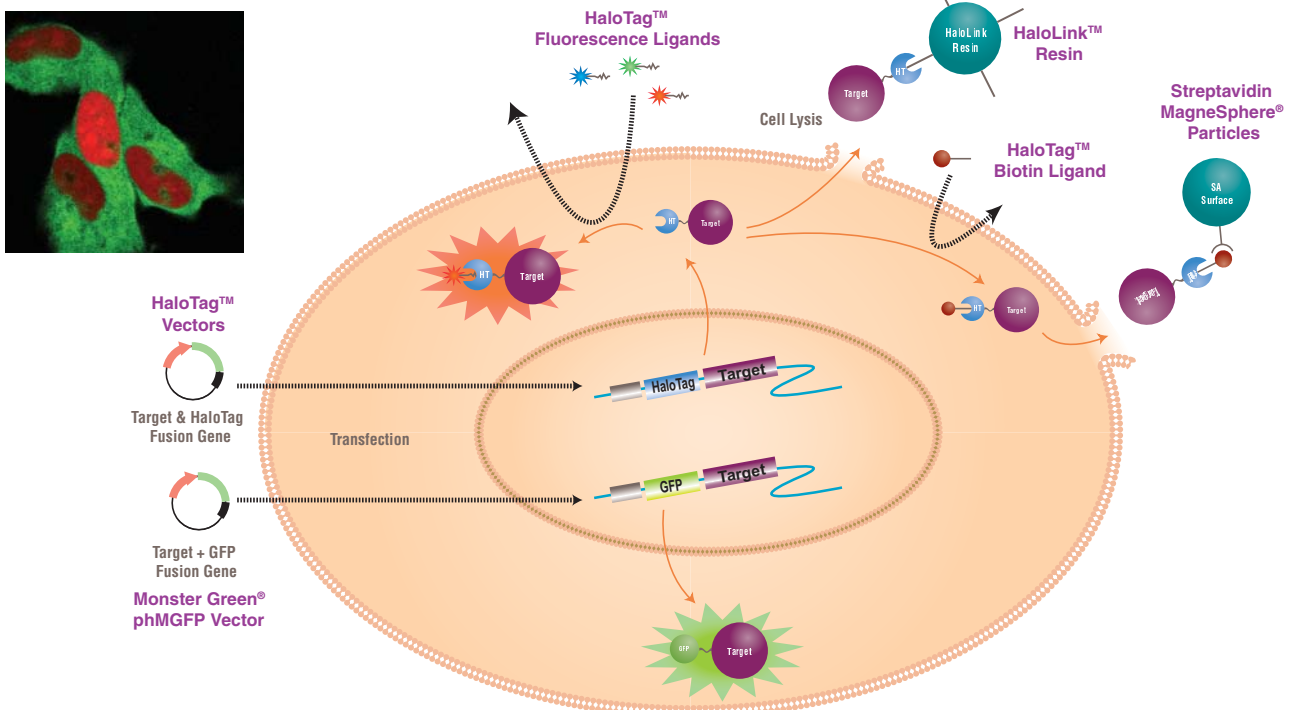
細胞外来性マーカーの定量と観察（レポーター解析）

細胞内で外来のレポーター（酵素・タグ）を発現させ、細胞内現象の測定/観察をする。

■ レポーターアッセイ（定量）



■ 標的タンパク質のイメージング（定性）と捕捉



■ レポーターアッセイの機能比較

アッセイシステム	Luciferase Assay System	Steady-Glo® Assay System	Bright-Glo™ Assay System	Renilla Assay System	EnduRen™ System	ViviiRen™ Substrate	Dual-Luciferase® Assay System	Dual-Glo™ Assay System	Chroma-Glo™ Assay System	Beta-Glo® Assay System
ページ	28	22	22	28	23	23	20	20	21	28
レポーター (測定対象)	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
測定形式 (発光タイプ)										
マルチポイント (長時間)				3						
マルチポイント (高レベル)					3					
エンドポイント (長時間)		3	3				3	3	3	
エンドポイント (高レベル)	3		3	3			3			
ホモジニアス		3	3				3	3	3	
感度	◎	○	◎	◎	○	◎	◎	○	△	○

● ホタルルシフェラーゼ [遺伝子 *luc*, *luc+*, *luc2* など] (pGL4 *luc2* Series Vector 28ページ)
 ● ウミシイタケルシフェラーゼ [遺伝子 *Rluc*, *hRluc* など] (pGL4 *hRluc* Series Vector 28ページ)
 ● クリックビートルルシフェラーゼ (赤) [遺伝子 *CBRluc*] (Chroma-Luc™ Vector 28ページ)
 ● クリックビートルルシフェラーゼ (緑) [遺伝子 *CBG68luc*, *CBG99luc*] (Chroma-Luc™ Vector 28ページ)
 ● β-ガラクトシダーゼ [遺伝子 *lacZ*] (pSV-β-Galactosidase Control Vector 28ページ)

※ルシフェラーゼアッセイの選択については www.promega.co.jp/jp/promotec_J/pdf/pj14/PJ-No14-02.pdf もご参照下さい。

■ イメージングおよび精製用タグの機能比較

特長	HaloTag™	GFP (hMGFP)	DsRed	GST	His
パルスチェイス実験	●	×	×	×	×
固定細胞のイメージング	●	△	△	×	×
生細胞のイメージング	●	●	●	×	×
固相支持体への固定	●	×	×	△	△
タンパク質の精製	●*	×	×	●	●
赤 (蛍光色)	●	×	●	×	×
緑 (蛍光色)	●	●	×	×	×
青 (蛍光色)	●	×	×	×	×
バックグラウンドが皆無	●	△	●	△	△
細胞毒性が皆無	●	△	△	×	×
タンパク質間相互作用の解析	●	×	×	●	×
ページ	24	26	—	—	—

● パフォーマンス確認済み △ 可能性あり × 不可 ※酵素によるタンパク質切断処理を伴う

※HaloTag™ Technology の詳細については www.promega.co.jp/jp/promotec_J/pdf/pj20/PJ-No20-5.pdf もご参照下さい。

デュアル-ルシフェラーゼアッセイ

発光

Dual-Glo™ Luciferase Assay System

ホタル/ウミシイタケルシフェラーゼ (グロータイプ: 連続アッセイ)

Dual-Glo™ Luciferase Assay System は、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。このシステムは、様々な哺乳動物細胞用の培地で機能するようにデザインされています。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。

ホモジニアス

培地を含む細胞に試薬を加えるだけのデュアルシステム

安定なシグナル

約2時間まで測光できるので、連続・バッチモードでの多検体処理に最適

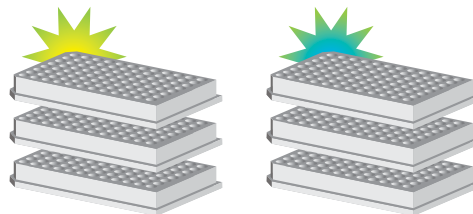
ワイドレンジ

2つのレポーターは6桁の直線性

正確

補正により、細胞数、細胞死、トランスフェクション効率、非特異的な細胞内応答による影響を排除

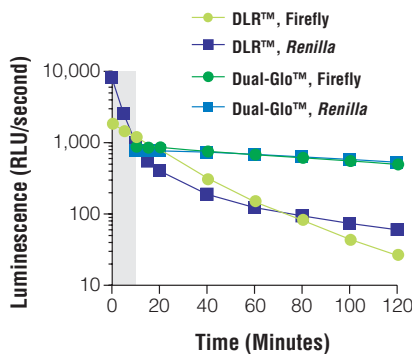
保存条件: -20℃



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)



Dual-Glo™およびDual-Luciferase® 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

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Dual-Glo™ Luciferase Assay System	10 ml	E2920	33,000
	100 ml	E2940	264,000
	10 × 100 ml	E2980	お問合せください

・ 10mlは96ウェルプレートの場合、130ウェル分に相当します。
・ 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/dualglo.html

Protocol No.

TM058

発光

Dual-Luciferase® Reporter Assay System

ホタル/ウミシイタケルシフェラーゼ (フラッシュタイプ: 連続アッセイ)

Dual-Luciferase® Reporter (DLR®) Assay Systemは、プロメガが初めて開発したデュアルルシフェラーゼレポーターシステムです。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) を連続して定量することができます。フラッシュタイプの発光により、attomole ($<10^{-18}$) レベルの検出感度と優れた直線性を示します。アッセイを行う場合は細胞溶解剤でライセートを調製し、一部を分取してからホタルおよびウミシイタケ用の発光試薬を順次加えます。

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	100 回分	E1910	27,500
Dual-Luciferase® Reporter Assay System 10-Pack	10 × 100 回分	E1960	218,000
Dual-Luciferase® Reporter 1000 Assay System	1000 回分	E1980	お問合せください

・ バルク注文については別途お問合せください。

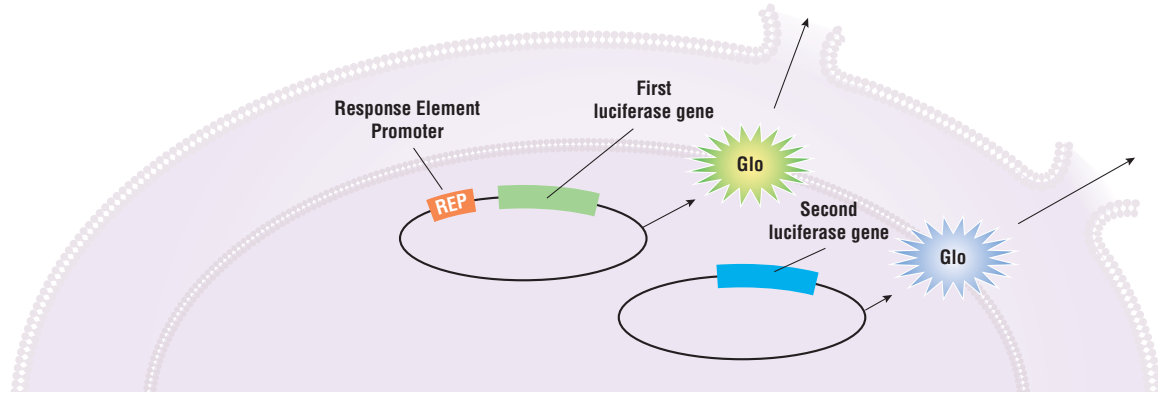
プロメガ資料

www.promega.co.jp/lit/dualluc.html

Protocol No.

TM040, TM046

デュアル-ルシフェラーゼアッセイ

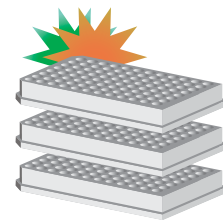


発光

Chroma-Glo™ Luciferase Assay System

クリックビートルルシフェラーゼ赤・緑 (グロータイプ: 同時アッセイ)

Chroma-Glo™ Luciferase Assay System は、1つのサンプルに1種類の試薬を添加することにより、同時に赤色/緑色 2種類の発光 (デュアル・カラー) を生成するシステムです。各Chroma-Luc™ Luciferase により生じる2色発光のフィルタリング測定により、各レポーターを区別し、事実上同時に測定することができます。半減期が30分以上の発光シグナルを生成するホモジニアスフォーマットのChroma-Glo™ Assayは、サンプルの前処理を必要とせず、多くのプレート进行处理することができます。セルベースアッセイからの情報量を増やすために、2つのレポーターを両方実験用レポーターとして利用するマルチプレックス実験にも使用することができます。(※本製品の使用には専用のフィルターが必要です)。



1ステップ Chroma-Glo™ Luciferase Assay

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

1種類の基質を加えるだけで2種類のレポーターを測定

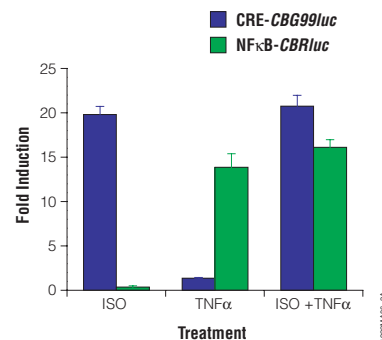
補正による正確性・精度の向上または両レポーターを実験用に使用するマルチプレックスに最適。

処理量の増加

マルチプレートのバッチ処理および連続処理に適した長時間発光 (発光半減期: 緑>5hr, 赤>30min)。

少ないステップ数

Chroma-Luc™ Reagent 1種類を培養中の細胞に直接添加し、測定するだけ。



保存条件: -20℃

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Chroma-Glo™ Luciferase Assay System	10 ml	E4910	27,500
	100 ml	E4920	220,000
	10×100 ml	E4950	お問合せください

・10mlは96ウェルプレートの場合、100ウェル分に相当します。
 ・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/chromaglo.html

Protocol No.

TM062

同一サンプルから2つの実験シグナルを個別にモニタリングするChroma-Luc™ テクノロジー

CREまたはNFκBコンセンサス配列をもつDNA断片をpCBG99-Basic (カタログ番号 E1431) または pCBR-Basic (カタログ番号 E1411) にクローニングした。このクローニングしたpCRE-CBG99/lucおよびpNFκB-CBR/lucを293細胞にコトランスフェクションし、24時間後、ISO (1μM)/ R0 (100μM)、TNFα (0.1μg/ml)/R0 (100μM)、ISO(1μM)/ R0 (100μM) + TNFα (0.1μg/ml)の各処理を行った。R0 (100μM) のみコントロールウェルにも添加した。処理6時間後、細胞を採取し、Chroma-Glo™ Reagentを用いてアッセイを行った。相対発光ユニットはレッドフィルター(610ロングパス)およびグリーンフィルター (510/ 60) をセットしたMithras LB940 (Berthold Technologies) で測定した。赤および緑色のシグナルはChroma-Luc™ Calculator (www.promega.com/chromacalc)でダウンロード可能で解析した。Fold inductions は各3処理の値をR0コントロール値で割った値で求めた。

シングル-ルシフェラーゼアッセイ

発光

Bright-Glo™ Luciferase Assay System Steady-Glo® Luciferase Assay System

シングル-ルシフェラーゼアッセイ (グロータイプ)

Bright-Glo™およびSteady-Glo® Luciferase Assay System は、ともにライセートの調製が不要なホモジニアスフォーマットのルシフェラーゼアッセイシステムで、従来のルシフェラーゼアッセイ試薬に比べ長い発光時間を特長とします。さらにそれぞれの特長として、Bright-Glo™ Systemの高い感度 (Steady-Glo® の約7~8倍)、Steady-Glo® Systemの発光時間 (Bright-Glo™の10倍) が挙げられます。ハイスループットスクリーニングに使用される96または384ウェルプレート用に最適化され、培地を除去したり細胞を洗浄する必要がなく、試薬を加えて1~2分以内に測光操作へ進むことができます。そのため、細胞を培養した同じマルチウェルプレートをそのまま測定できます。

また、別売のGlo Lysis bufferでライセートを調製し、一部をアッセイに使用する方法も行えます (ノン-ホモジニアスアッセイ)。標準的なルシフェラーゼアッセイで、より高い感度*、利便性を求めの方にもご利用いただけます。

*プロトコール通り、試薬と同量のライセート (100μl) を用いた場合 (標準的なLuciferase Assay Systemの場合、試薬100μlに対してライセート20μlを使用)。

ホモジニアス

1種類の試薬を加えるだけ
(培地の除去、細胞の洗浄、細胞の溶解が不要)

正確な定量

混合具合、蒸発、ピペッティング操作によるエラーに左右されにくいいため、マルチウェルプレートにおける再現性が優れています

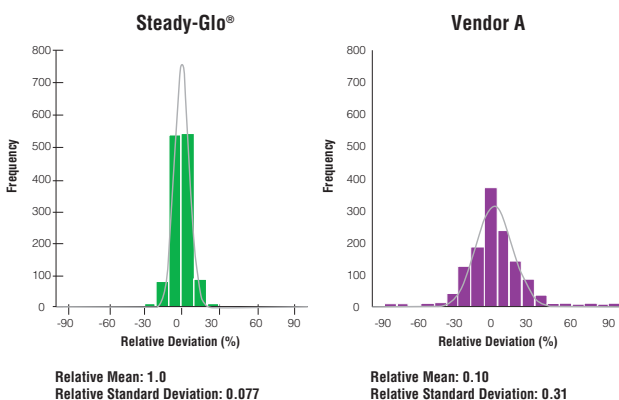
便利

基質溶解液が室温で保存できるので、解凍、平衡化が不要

様々な培地に適応

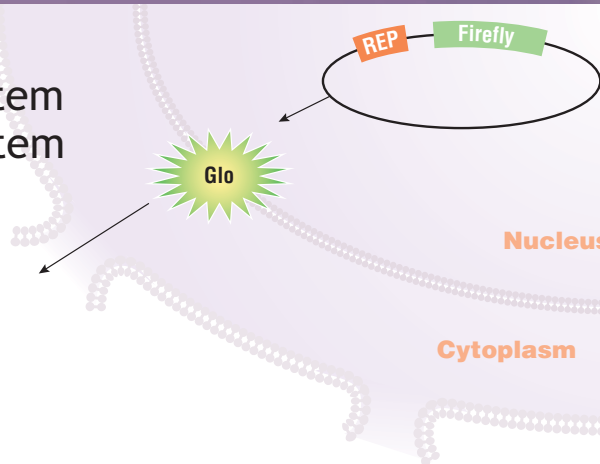
RPMI, DMEM, MEM, F12などに対応し、フェノールレッドの影響も低減

保存条件: -20℃



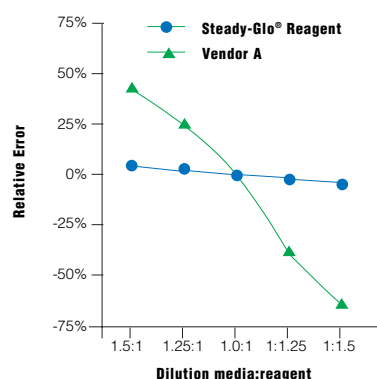
384ウェルプレートにおける定量精度の比較

ルシフェラーゼ遺伝子を安定に導入したCHO細胞で測定しました。Relative Deviationが中心 (0%) 付近に多く分布するほど高い精度を示します (実線はガウス分布を示す)。



Steady-Glo® とBright-Glo™ の違い

	光の半減期	相対感度	主な用途
Steady-Glo®	約5時間	1倍	バッチモード
Bright-Glo™	約30分	7~8倍	連続モード



試薬の濃度変化による測定精度への影響

ホタルルシフェラーゼを96ウェルプレートに1ウェルあたり100μl分注し、Steady-Glo® 試薬と他社試薬Aを上にも示されるような希釈率になるように添加した。

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Bright-Glo™ Luciferase Assay System	10ml	E2610	17,500
	100ml	E2620	98,000
	10×100ml	E2650	お問合せください
Steady-Glo® Luciferase Assay System	10ml	E2510	15,500
	100ml	E2520	87,000
	10×100ml	E2550	お問合せください
Glo Lysis Buffer, 1×	100ml	E2661	10,000

・10mlは96ウェルプレートの場合、100ウェル分に相当します。
・パ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/brightglo.html
www.promega.co.jp/lit/steadyglo.html

Protocol No.

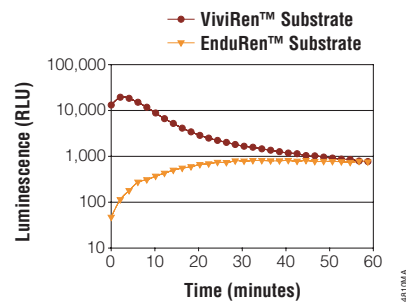
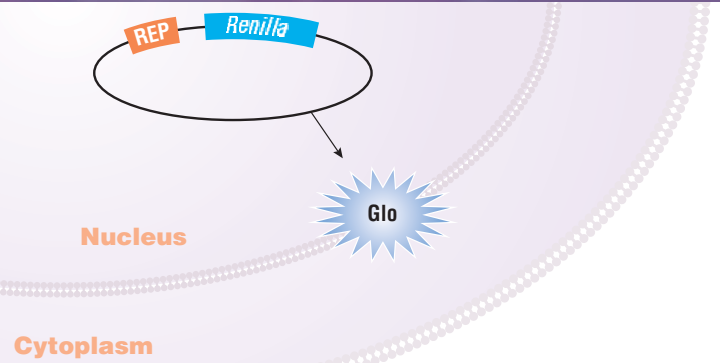
TM052, TM051

発光

EnduRen™ Live Cell Substrate ViviRen™ Live Cell Substrate

ライブセル-ルシフェラーゼアッセイ (マルチポイント)

EnduRen™ および ViviRen™ Live Cell Substrateは、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が付加しており、酸化を受けるサイトがブロックされています。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。一般的な培地に溶かして使用するため、アッセイ用の試薬を後で添加する必要もありません。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。これらの基質はマルチウェルでのマルチポイント(リアルタイム)測定が可能であるためレポーターアッセイ、RNAi、BRETなど様々なセルベース分析に応用することができます。また、ウミシイタケルシフェラーゼ活性測定後は、細胞溶解アッセイと併用したマルチアッセイも可能です。



ViviRen™ および EnduRen™ Substrate による発光の比較

ウミシイタケルシフェラーゼを安定に発現するCHO細胞を60μMのViviRen™ およびEnduRen™ Substrateに暴露し、2分後から発光を連続測定した。約45分後には2つのサンプルセットの発光レベルは同等になった。45~60分以上の測定を必要とするサンプルの場合は、安定した発光を長時間得るためにEnduRen™ Substrateの使用を推奨します。

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

連続的なアッセイ&スクリーニング

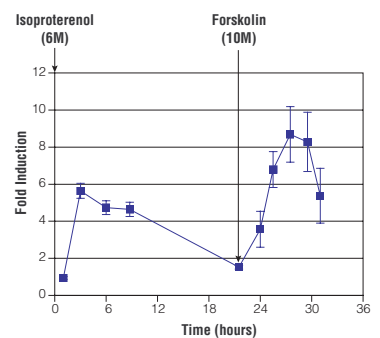
1つの細胞集団を用いた反復測定を通じて迅速に定量パラメータを得ることができ、アッセイごとに試薬を添加する必要が無い(予め培地に溶かすだけ)ので、スループットが増加

マルチアッセイ

CellTiter-Glo®などの細胞溶解をとまなうアッセイ法と組み合わせで、より精度の高いアッセイが可能

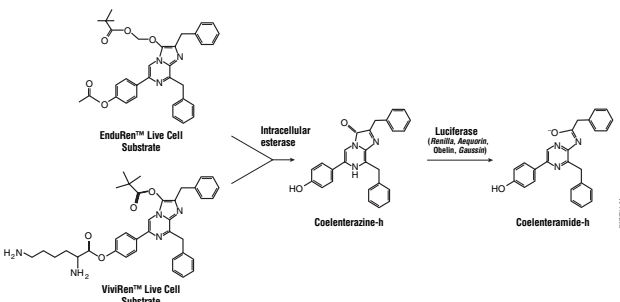
高いシグナルバックグラウンド比

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



EnduRen™を用いた24時間以上のマルチポイント測定

保存条件: -20℃ (E6491は長期保存の場合70℃)



生細胞内におけるEnduRen™ および ViviRen™ Live Cell Substrate の反応

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
EnduRen™ Live Cell Substrate	1プレート分 (0.34mg)	E6481	23,000
	10プレート分 (3.4mg)	E6482	143,000
	100プレート分 (34mg)	E6485	お問合せください
ViviRen™ Live Cell Substrate	1プレート分 (0.37mg)	E6491	24,000
	10プレート分 (3.7mg)	E6492	148,500
	100プレート分 (37mg)	E6495	お問合せください

・E6491はDMSO溶液として、その他の基質は凍結乾燥品として供給されます。E6481およびE6491は培地10ml(終濃度60μM)に充分量です。

・バルク注文については別途お問合せ下さい。

プロメガ資料

www.promega.co.jp/lit/enduren.html

www.promega.co.jp/lit/viviren.html

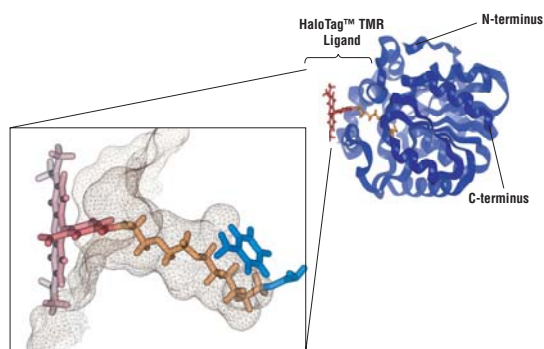
Protocol No.

TM244, TM064

HaloTag™ Interchangeable Labeling Technology

融合タンパク質の多機能性ラベリングシステム

HaloTag™ Interchangeable Labeling Technologyは、HaloTag™ タンパク質（またはその融合タンパク質）を哺乳動物細胞で発現させることにより、生細胞または固定細胞内におけるHaloTag™ タンパク質の局在を蛍光でイメージングすることのできる新規なツールです。また、発現させた融合タンパク質の翻訳後修飾の解析やタンパク質/タンパク質複合体の単離などにも使用することができます。このテクノロジーでは、HaloTag™ 発現ベクターにコードされている特殊なHaloTag™ タンパク質が受け皿となり、後で添加するHaloTag™ リガンドが特異的に共有結合します。この結合（標識）は細胞内、溶液中または固相上で速やかに形成され、実質的に不可逆性であるため厳しい実験条件下でも安定です。また、このHaloTag™ タンパク質（バクテリア haloalkane dehalogenase 由来）は哺乳動物細胞には内在しないため、バックグラウンドはほとんどありません。HaloTag™ ベクターにはHaloTag™ タンパク質がコードされており、融合タンパク質を発現できるようにデザインされています。リガンドには様々な機能を携行することができ、現在提供しているリガンドとして、迅速に細胞膜を透過する赤、緑、青の蛍光リガンドおよび透過性の異なる2種類のビオチンリガンドがあります。任意のリガンドを製作していただくために標識が容易な未標識リガンドも用意しています。また、HaloLink™ ResinはHaloTag™ タンパク質を直接捕捉するための固相支持体です。



HaloTag™ タンパク質とリガンドの結合

1つのコンストラクトに対して多様な標識が可能

リガンドを変えるだけで、新たに発現用のコンストラクトを作らずに新たな機能を発揮（多色イメージング～精製）

強力な結合

HaloTag™ タンパク質は共有結合によりHaloTag™ リガンドで標識されるため、細胞の固定処理や非特異的結合物除去のための強い洗浄操作が行え、SDS-PAGEや質量分析にも使用可能。

細胞内で標識

HaloTag™ リガンドは細胞膜を透過し、迅速にHaloTag™ タンパク質に結合します。未結合のリガンドは簡単な洗浄で排除でき、バックグラウンドはほとんどありません。細胞毒性も最低レベル

融合タンパク質の捕捉

ビオチンリガンドとアビジン粒子による間接的捕捉、HaloLink™ による直接的捕捉

用途

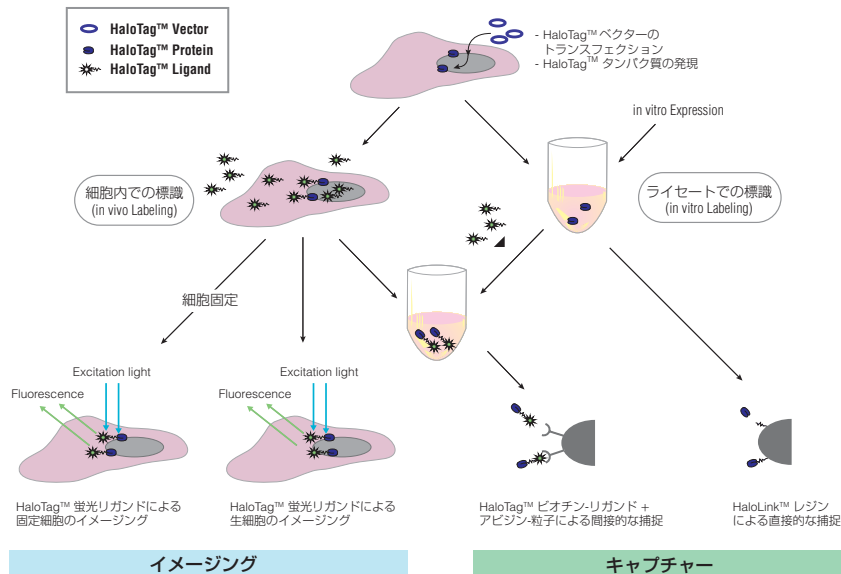
イメージング

- ・ 生細胞：タンパク質の局在・動態観察、時間差標識によるパルスチェイス
- ・ 固定細胞：固定後も蛍光を維持し、免疫染色との併用も可能
- ・ 多重染色：蛍光タンパク質や免疫染色との併用によるマルチカラーイメージング
- ・ ゲル分析：蛍光標識したタンパク質は抗体を用いずにそのままゲルイメージング

キャプチャー

- ・ タンパク質間相互作用：担体を利用したプルダウン
- ・ 酵素活性測定：HaloLink™ Resinで単離した融合タンパク質の活性測定
- ・ 精製：pFC8A/8K Vector から発現した融合タンパク質はFactor Xa プロテアーゼによるタグの除去が可能

保存条件：-20℃



HaloTag™ Technology の操作概要とアプリケーション

細胞にHaloTag™ 発現ベクターをトランスフェクションした後、HaloTag™ タンパク質（または融合タンパク質）が細胞内で発現。

イメージングでは蛍光リガンド (TMR, diAcFAM, Coumarin)、キャプチャーではビオチンリガンド (Biotin, PEG-Biotin) でHaloTag™ タンパク質を標識。

イメージング：

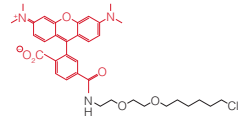
- ・ 生細胞または固定後のイメージング
- ・ ライセート調製後のゲルイメージング

キャプチャー：

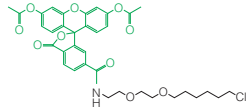
- ・ ビオチン/アビジンによる間接的捕捉
- ・ HaloLink™ による直接的な捕捉

HaloLink™ レジンは直接的、強力にHaloTag™ タンパク質を捕捉するため、*in vitro* 発現など、低濃度でのタンパク質捕捉に最適です。

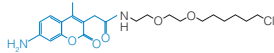
HaloTag™ TMR Ligand
555_{Ex}/585_{Em}



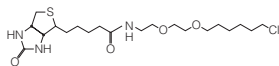
HaloTag™ diAcFAM Ligand
494_{Ex}/526_{Em} (after hydrolysis)



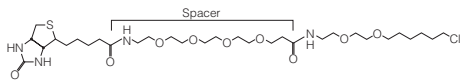
HaloTag™ Coumarin Ligand
353_{Ex}/434_{Em}



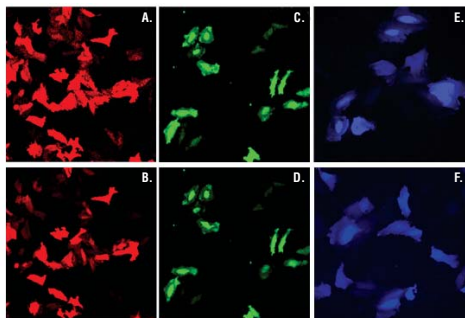
HaloTag™ Biotin Ligand



HaloTag™ PEG-Biotin Ligand

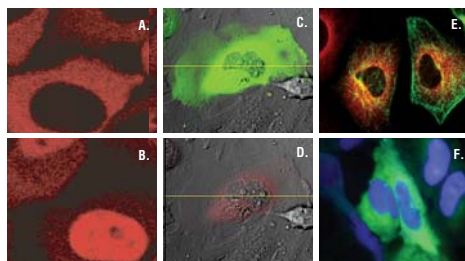


各種 HaloTag™ リガンドの構造



3種の蛍光HaloTag™ Ligandを用いたHaloTag™タンパク質のイメージング

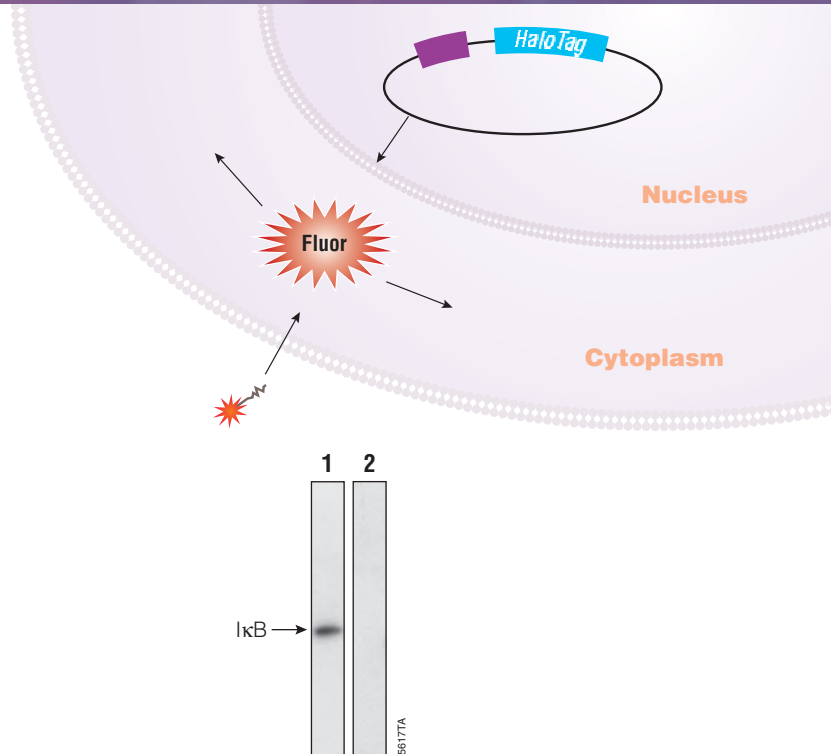
HeLa細胞にHaloTag™ 発現ベクターをトランスフェクションし、TMR Ligand (パネルA, B)、diAcFAM Ligand (パネルC, D)、Coumarin Ligand (パネルE, F) で標識した。パネルB, D, F では標識後に細胞を固定した。



HaloTag™ を用いたイメージング例

パネルA, B) タンパク質の動態解析 (細胞質から核への移動)、パネルC, D) 時間差標識によるパルスチエイセス分析、パネルE) TMR Ligand による標識と細胞固定後の免疫染色による2重染色。パネルF) 蛍光タンパク質 (hMGFP) とCoumarin Ligandとの2重染色。

※ベクター購入における注意点: HaloTag™ Technology で使用するリガンドをプロメガ以外で作製・入手する場合、または研究用途以外でご利用される場合、ライセンス契約の必要があります。詳細については弊社までご連絡ください (www.promega.co.jp/license/)。



タンパク質間相互作用のin vivoにおける検出

HeLa細胞にp65-HaloTag™ 融合タンパク質をコードするpFC8Aをトランスフェクションし、24時間後に細胞ライセートを調製した。細胞ライセートにHaloLink™ Resinを添加し、非トランスフェクション細胞も同様に処理して陰性対照とした。レジンを細胞ライセートを室温で1時間インキュベーション後、洗浄した。SDS-PAGEの後、抗IκB抗体を用いたウェスタンブロット法により分析した。レーン1、レジンから溶出したトランスフェクション細胞由来タンパク質; レーン2、対照検体 (非トランスフェクション細胞)。

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
ベクター			
HaloTag™ pHT2 Vector	20µg	G8241	製造中止
pFC8A (HaloTag™) CMV Flexi® Vector	20µg	C3631	48,000
pFC8K (HaloTag™) CMV Flexi® Vector	20µg	C3641	48,000
標識リガンド			
HaloTag™ TMR Ligand	30µl	G8251	75,000
HaloTag™ diAcFAM Ligand	30µl	G8271	75,000
HaloTag™ Coumarin Ligand	30µl	G8581	75,000
HaloTag™ Biotin Ligand	30µl	G8281	75,000
HaloTag™ PEG-Biotin Ligand (for in vitro labeling)	30µl	G8591	75,000
・ 標識リガンドは通常1000倍に希釈して使用します。 ・ HaloTag™ PEG-Biotin Ligandは細胞透過性が低いため、ライセートを用いたin vitro 標識にご利用ください。			
未標識リガンド			
HaloTag™ Iodoacetamide ligand	5mg	P1681	95,000
HaloTag™ Succinimidyl Ester (O2) ligand	5mg	P1691	95,000
HaloTag™ Amine (O2) ligand	5mg	P6711	95,000
精製・固定担体			
HaloLink™ Resin	2ml	G1911	27,000
	5ml	G1912	58,000
Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles	9ml	Z5481	20,000
	25ml	Z5482	54,000
Factor Xa Protease	50µg	V5581	17,500

プロメガ資料

www.promega.co.jp/lit/halotag.html

Protocol No.

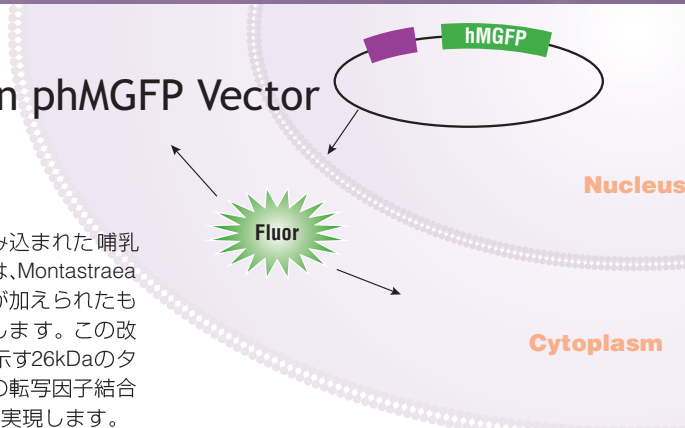
TM260

蛍光

Monster Green™ Fluorescent Protein pHMGFP Vector

より強い蛍光と持続性を示す新しいGFP (蛍光)

このベクターは、Monster Green™ Fluorescent Proteinの遺伝子が組み込まれた哺乳動物用発現ベクターです。Monster Green™ Fluorescent Protein 遺伝子は、Montastraea cavernosa (Great Star Coral) からクローニングされ、人為的に改良が加えられたもので、発現タンパク質はGFP (Green Fluorescent Protein) として機能します。この改良型遺伝子 (hMGFP) は、ネイティブ型 (MGFP) に比べ強い蛍光強度を示す26kDaのタンパク質を発現します。さらに、hMGFPはコドンの最適化とほとんどの転写因子結合サイト共通配列が除去されているため、信頼性のある高レベルの発現を実現します。



強い蛍光発光

EGFPに比べ高い蛍光強度 (20% Up)。

低い細胞毒性

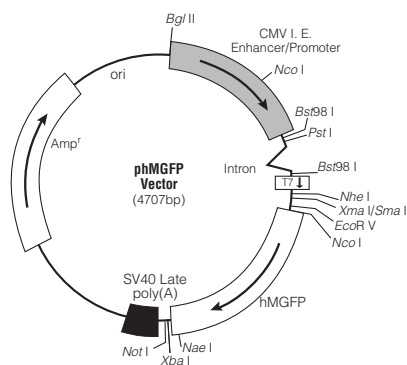
細胞に対する毒性を低減。

安定発現

転写因子結合サイトの除去およびコドンの最適化による安定した高効率発現 (MGFP → hMGFP)。

高純度

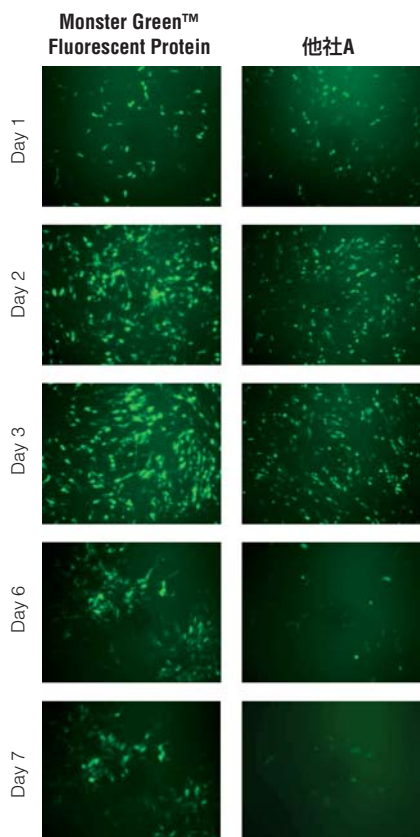
そのままトランスフェクションが行えるので、クローニング前の発現確認実験に便利。



pHMGFP Vectorのサークルマップとマルチクローニング領域

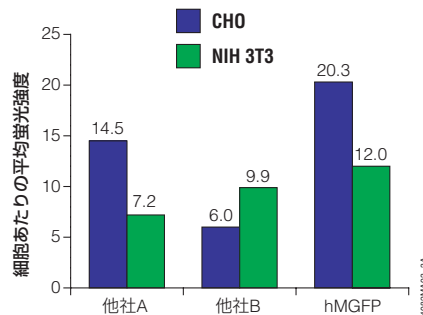
図中の“hMGFP”は、hMGFPの読み枠; Amp^rは*E. coli*でのアンピシリン耐性を与える遺伝子; oriは*E. coli*でのプラスミド複製開始点。hMGFPおよびAmp^r遺伝子内の矢印は転写方向を示す。

保存条件: -20℃



発現の持続性

他社AおよびhMGFPの*gfp*遺伝子を含む哺乳動物発現ベクターをNIH3T3細胞にそれぞれトランスフェクションした。2日ごとに培地を交換し、選択用の試薬は添加しなかった。顕微鏡による分析は、Zeiss Axiovert® S100 fluorescent microscope (470/40nm 励起フィルター、515nm ロングパス蛍光フィルター) を用いた。イメージデータはSpot Diagnostic Imaging equipmentで収集した。追試実験でも同様な結果が得られた。



トランスフェクション細胞あたりの平均蛍光強度

全ての*gfp*遺伝子は、同じ哺乳動物発現ベクター (pCI-neo) にクローニングし、CHOまたはNIH3T3細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション24時間後、細胞をトリプシン処理し、Coulter Elite™ FACS™ Instrument (標準アルゴンレーザー[488nm]励起、530/30nm 蛍光フィルター) で50,000個の細胞を解析した。蛍光細胞 (トランスフェクション済み) と非蛍光細胞 (トランスフェクションなし) の細胞集団に分け、トランスフェクション細胞あたりの平均蛍光強度として表した。

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Monster Green™ Fluorescent Protein pHMGFP Vector	20µg	E6421	86,000

※ベクター購入における注意点: hMGFP 遺伝子を研究用途で使用する場合、ライセンス契約の必要はございません。研究用途以外でご利用される場合は、別途ライセンス契約が必要です。詳細については弊社までご連絡ください (www.promega.co.jp/license/)。

プロメガ資料

www.promega.co.jp/lit/monstergrn.html

Protocol No.

TB320

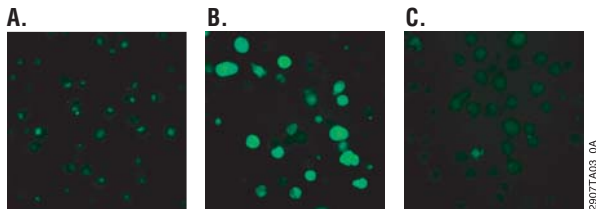
蛍光

Cell-Staining

セルイメージングに最適なプローブ、抗体

■ アポトーシス細胞のイメージング

CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Markerは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 (蛍光顕微鏡、フローサイトメトリー)。FITC-VAD-FMKは、DMSOに溶解された5mM溶液として供給されます。Anti-Fas処理したJurkat細胞に使用する場合は10μM程度です。



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。

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker	50μl	G7461	33,000
	125μl	G7462	70,000

関連製品

TUNEL法

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System	60回分	G3250	58,000
DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System	40回分	G7130	58,000
	20回分	G7360	38,000

カスパーゼ阻害剤

Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK	50μl	G7231	35,000
Caspase Inhibitor Ac-DEVD-CHO	100μl	G5961	25,000

■ 蛍光プローブ

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
DAPI (核酸)	10mg	P5521	製造中止
Hoechst 33342 (核酸)	100mg	P5541	製造中止
JC-1 (膜電位)	5mg	P5551	製造中止
Dil (細胞膜)	25mg	P5491	製造中止
Calcein, Acetoxymethyl Ester (生細胞)	1mg	P1901	製造中止
CTC - MaxxPure™ Grade (生細胞)	100mg	P5511	製造中止

■ 細胞免疫染色 (1次抗体)

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
細胞マーカー			
Anti-βIII Tubulin mAb	100μg	G7121	51,500
Anti-GFAP pAb	100μg	G5601	27,500

シグナル伝達関連

Anti-ACTIVE® CaM KII pAb, Rabbit, (pT ²⁸⁶)	40μl	V1111	65,000
Anti-ACTIVE® JNK pAb, Rabbit, (pTPpY)	40μl	V7931	65,000
Anti-ACTIVE® JNK pAb, Rabbit, (pTPpY)	120μl	V7932	130,000
Anti-ACTIVE® MAPK pAb, Rabbit, (pTEpY)	40μl	V8031	65,000
Anti-ACTIVE® p38, Rabbit (pTGpY)	100μl	V1211	65,000
Anti-pT ¹⁸³ MAPK pAb, Rabbit	50μl	V8081	65,000
Anti-ERK 1/2 pAb, Rabbit	40μl	V1141	35,000

成長因子関連

Anti-Human BDNF pAb	200μg	G1641	56,000
Anti-Rat CNTF pAb	200μg	G1631	56,000
Anti-NGF mAb	100μg	G1131	88,000
Anti-NGF mAb	20μg	G1132	22,000
Anti-Human NT-3 pAb	200μg	G1651	56,000

レセプター関連

Anti-Human p75 pAb	200μg	G3231	58,500
Anti-TrkB In pAb	100μg	G1561	35,000

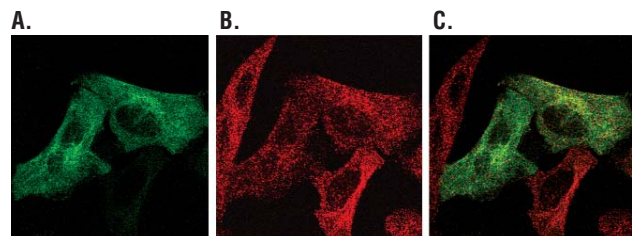
アポトーシス関連

Anti-Cytochrome C mAb	100μg	G7421	47,000
Anti-PARP p85 Fragment pAb	50μl	G7341	58,000
Anti-ACTIVE® Caspase-3 pAb	50μl	G7481	39,000
Anti-pS ⁴⁷³ Akt pAb	40μl	G7441	45,000

レポーター関連

Anti-Luciferase pAb	200μg	G7451	29,500
Anti-β-Galactosidase, Purified Monoclonal Antibody	100μg	Z3781	5,500
Anti-β-Galactosidase, Purified Monoclonal Antibody	2mg	Z3783	44,000

※交差反応性などの詳細については www.promega.com/techserv/tools/abasst/ をご覧ください。



HaloTag™ 標識およびAnti-βIII-Tubulin mAbによる免疫細胞染色によるマルチプレックス分析

HeLa 細胞にHaloTag™-α-tubulinをトランスフェクションし、HaloTag™ diAcFAM で標識した後、洗浄、固定を行った。0.1% Triton® X-100で透過処理し、Anti-βIII-Tubulin mAb (5,000倍希釈、カタログ番号G7121) で免疫標識した。細胞は500倍に希釈したAlexa Fluor™ 488 標識2次抗体とともにインキュベーションした。パネルA：HaloTag™リガンドのみの染色像 (diAcFAM リガンド)。パネルB：βIII-Tubulin のみの染色像。パネルC：HaloTag™ タンパク質およびβIII-Tubulinの2重染色像。

関連製品

製品名	サイズ	カタログ	価格(¥)
-----	-----	------	-------

細胞生存/毒性試験

細胞生存/毒性試験			
CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive 1000 ウェル分 Cell Proliferation Assay (MTS)		G5421	18,000
CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive 5000 ウェル分 Cell Proliferation Assay (MTS)		G5430	59,000
CellTiter 96® AQueous MTS Powder	1g	G1111	96,000
CellTiter 96® AQueous MTS Powder	250mg	G1112	38,000
CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTT)	1000 ウェル分	G4000	21,000
CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTT)	5000 ウェル分	G4100	59,000
CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (LDH)	1000 ウェル分	G1780	35,000

バクテリア生存試験

BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay	10ml	G8230	13,000
BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay	100ml	G8232	51,500

成長因子

hBDNF	5µg	G1491	54,000
rhEGF	100µg	G5021	22,000
rhFGF, Basic	25µg	G5071	42,000
rhGDNF	5µg	G2781	54,000
rhIGF-I	25µg	G5111	43,000
rhIL-4	5µg	G5591	32,000
mNGF, 2.5S	100µg	G5141	49,500
mNGF, 7S	100µg	G5151	製造中止
rhNT-3	5µg	G1501	54,000
rhTNF-α	10µg	G5241	44,000

レポーター関連

ホタルルシフェラーゼレポーターベクター

pGL4.10[<i>luc2</i>] Vector	20µg	E6651	64,000
pGL4.11[<i>luc2P</i>] Vector	20µg	E6661	64,000
pGL4.12[<i>luc2CP</i>] Vector	20µg	E6671	64,000
pGL4.13[<i>luc2/SV40</i>] Vector	20µg	E6681	64,000
pGL4.14[<i>luc2/Hygro</i>] Vector	20µg	E6691	64,000
pGL4.15[<i>luc2P/Hygro</i>] Vector	20µg	E6701	64,000
pGL4.16[<i>luc2CP/Hygro</i>] Vector	20µg	E6711	64,000
pGL4.17[<i>luc2/Neo</i>] Vector	20µg	E6721	64,000
pGL4.18[<i>luc2P/Neo</i>] Vector	20µg	E6731	64,000
pGL4.19[<i>luc2CP/Neo</i>] Vector	20µg	E6741	64,000
pGL4.20[<i>luc2/Puro</i>] Vector	20µg	E6751	64,000
pGL4.21[<i>luc2P/Puro</i>] Vector	20µg	E6761	64,000
pGL4.22[<i>luc2CP/Puro</i>] Vector	20µg	E6771	64,000

ウミシイタケルシフェラーゼレポーターベクター

pGL4.70[<i>hRluc</i>] Vector	20µg	E6881	64,000
pGL4.71[<i>hRlucP</i>] Vector	20µg	E6891	64,000
pGL4.72[<i>hRlucCP</i>] Vector	20µg	E6901	64,000
pGL4.73[<i>hRluc/SV40</i>] Vector	20µg	E6911	64,000
pGL4.74[<i>hRluc/TK</i>] Vector	20µg	E6921	64,000

製品名	サイズ	カタログ	価格(¥)
pGL4.75[<i>hRluc/CMV</i>] Vector	20µg	E6931	64,000
pGL4.76[<i>hRluc/Hygro</i>] Vector	20µg	E6941	64,000
pGL4.77[<i>hRlucP/Hygro</i>] Vector	20µg	E6951	64,000
pGL4.78[<i>hRlucCP/Hygro</i>] Vector	20µg	E6961	64,000
pGL4.79[<i>hRluc/Neo</i>] Vector	20µg	E6971	64,000
pGL4.80[<i>hRlucP/Neo</i>] Vector	20µg	E6981	64,000
pGL4.81[<i>hRlucCP/Neo</i>] Vector	20µg	E6991	64,000
pGL4.82[<i>hRluc/Puro</i>] Vector	20µg	E7501	64,000
pGL4.83[<i>hRlucP/Puro</i>] Vector	20µg	E7511	64,000
pGL4.84[<i>hRlucCP/Puro</i>] Vector	20µg	E7521	64,000

クリックビートルシフェラーゼレポーターベクター

pCBR-Basic Vector	20µg	E1411	49,500
pCBR-Control Vector	20µg	E1421	49,500
pCBG68-Basic Vector	20µg	E1431	49,500
pCBG68-Control Vector	20µg	E1441	49,500
pCBG99-Basic Vector	20µg	E1451	49,500
pCBG99-Control Vector	20µg	E1461	49,500

ツーハイブリットシステム用ルシフェラーゼレポーターベクター

CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System	1システム	E2440	108,000
CheckMate™/Flexi® Vector Mammalian Two-Hybrid System	1システム	C9360	110,000

siRNA検定用ルシフェラーゼレポーターベクター

psiCHECK™ -1 Vector	20µg	C8011	48,000
psiCHECK™ -2 Vector	20µg	C8021	55,000

ホタルルシフェラーゼアッセイ (フラッシュ: シングル)

Luciferase Assay System	100回分	E1500	14,500
Luciferase Assay System with Reporter Lysis Buffer	100回分	E4030	15,500
Luciferase Assay Reagent	1000回分	E1483	83,500

ウミシイタケルシフェラーゼアッセイ (フラッシュ: シングル)

<i>Renilla</i> Luciferase Assay System	100回分	E2810	16,500
<i>Renilla</i> Luciferase Assay System	1000回分	E2820	88,000

β-ガラクトシダーゼアッセイ & ベクター

Beta-Glo® Assay System	10ml	E4720	14,500
Beta-Glo® Assay System	100ml	E4740	102,500
pSV-β-Galactosidase Control Vector	20µg	E1081	16,500

トランスフェクション関連試薬

TransFast™ Transfection Reagent	1.2mg	E2431	38,500
Antibiotic G-418 Sulfate	1g	V7982	15,000
Antibiotic G-418 Sulfate Solution	20ml	V8091	17,000

ルミノメーター

GloMax™ 20/20n Luminometer (本体)	1台	E5311	1,100,000
GloMax™ 20/20n Luminometer with Dual Injectors (本体+ インジェクター2本)	1台	E5331	1,900,000
GloMax™ 96 Microplate Luminometer (本体)	1セット	E6501	2,500,000
GloMax™ 96 Microplate Luminometer with Single Injector (本体+ インジェクター1本)	1セット	E6511	3,000,000
GloMax™ 96 Microplate Luminometer with Dual Injectors (本体+ インジェクター2本)	1セット	E6521	3,500,000

日本語 Web site : www.promega.co.jp

テクニカルサービス • Tel. 03-3669-7980 / Fax. 03-5614-6079 • 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1F
Tel. 03-3669-7981 / Fax. 03-3669-7982

大阪事務所 〒532-0011
大阪府大阪市淀川区西中島6-8-8 花原第3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 2009年6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