

プロメガ
テクノロジー
による

最新 がん研究実験法

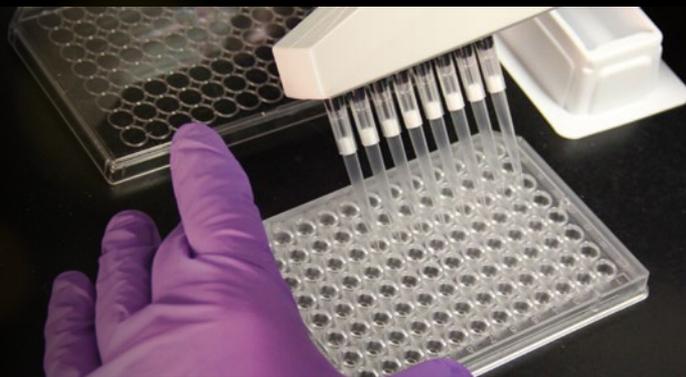
発光ルシフェラーゼ検出テクノロジー

- **がん免疫研究に最適!**
細胞毒性・傷害性試験への新しいアプローチ (2)
- **細胞死からの回避 vs 制御**
細胞死メカニズムの解析 (4)
- **がん細胞・免疫細胞の代謝変化を追え!**
細胞内代謝変化をプレートリーダーで測定 (6)
- **タンパク質安定化および転写活性を定量化** 2019 ノーベル賞
関連
がん低酸素応答 (8)
- **タンパク質ケミカルロックダウン**
標的タンパク質を分解 (10)
- **シグナルの変調①**
GPCR によるシグナルの異常 (12)
- **シグナルの変調②**
キナーゼの無秩序なシグナル (14)
- **エピジェネティック制御の変調**
最新エピジェネティクス研究ツール (16)

核酸精製 & 増幅テクノロジー

- **バイオマーカー探索**
分子マーカー探索 (20)
- **遺伝子検査・コンパニオン診断**
ゲノム不安定性と核酸精製 (22)
- **その細胞株、大丈夫ですか?**
細胞認証試験 (24)

Focused Support for Scientists
Working for a Cancer-Free World



2019 年 ノーベル生理学・医学賞
細胞の低酸素応答!
8 ページ 低酸素応答研究ツールもご覧ください。

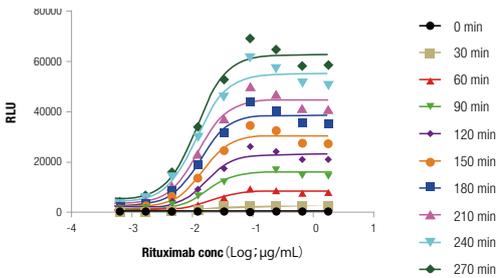
がん免疫研究に最適！ 細胞毒性・傷害性試験への新しいアプローチ

HB-T ターゲット細胞の細胞毒性応答検出 (基礎研究に最適)

化合物や薬剤による細胞毒性あるいは免疫細胞による細胞傷害性を共培養により測定する方法は、初期スクリーニングまたは動物実験の代替法として一般に用いられています。1960年代より、Cr⁵¹を取り込ませた細胞が障害されるとCr⁵¹が放出される方法が開発されて、さまざまな細胞毒性試験に利用されましたが、放射性物質の危険性、廃棄コストなどの問題から多くのアプリケーションでは細胞内在性の酵素や分子をマーカーとして測定する Non-RI 法へシフトしてきました (LDH アッセイ、DNA 染色など)。その中でも LDH は安定性に優れた酵素であることに加えてこれまでに多くの実績があり、細胞毒性のゴールドスタンダードマーカーとして利用されています。近年では初代培養細胞や 3D 細胞など、より生体を反映した実験系が利用されるようになり、少数の細胞でも鋭敏に細胞死を検出できる高感度なアッセイ方法が求められています。

プロメガの発光 LDH アッセイは従来の発色法、蛍光法よりも非常に高感度なので、これまで差が見えづらかった実験系や暴露時間の比較長い実験系にも対応する優れた細胞毒性試験試薬です。

複数の細胞種が混在する中で、標的細胞の細胞死を検出する細胞傷害性試験は抗体医薬・バイオロジクスおよび細胞治療 (例: CAR-T, CAR-NK 細胞) などの開発で利用されます。従来法ではバックグラウンドが高く、低感度でしたが、プロメガの発光タグ技術を利用すればこれまでに無い高感度な細胞傷害性試験を行うことができます。

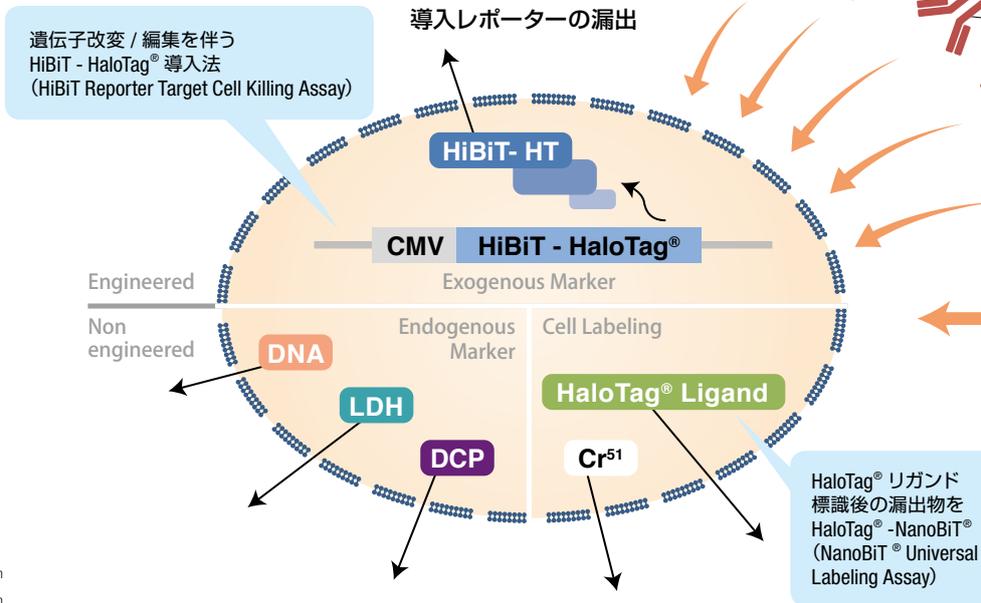


NanoBiT® Universal Cell Labeling Assay によるリアルタイム ADCC アッセイ

PBMC エフェクター細胞および HaloTag® リガンドで標識された Raji (CD20+) 標的細胞を共培養し、表示濃度の Rituximab (anti-CD20) で処理し、Vivazine™ Extended Live Cell Substrate を用いてアッセイを行った。30 分毎に GloMax® Discover で発光を測定した。

Modalities

低分子・中分子
腫瘍溶解性ウイルス



細胞内マーカーの漏出

< 用途 >

- CAR-T/TCR-T mediated killing
- ADCC mediated via PBMCs
- T cell mediated killing via BiTEs
- 3D 細胞、オルガノイド etc

ターゲット細胞の毒性検出 (がん細胞)

細胞毒性アッセイ比較表

マーカー	製品名 (製品番号)	前作業	検出	標的細胞死	感度	リアルタイム & カイネテック
HaloTag® -HiBiT & NanoBiT®	NanoBiT® Universal Cell Labeling Assay (開発中)	細胞標識	発光			△
	HiBiT Reporter Target Cell Killing assay	遺伝子導入	発光 / [蛍光] (イメージ)	◎	◎	○
	Reporter (HaloTag® -HiBiT) Vector (CS1956B01*)					
LDH	LDH-Glo™ (J2380) おすすめ!	なし (内在マーカーの検出)	発光		◎	○
	CytoTox96® (G1780)		発色		△	×
DNA	CellTox™ Green (G8741) おすすめ!	なし (内在マーカーの検出)	蛍光	△	○	○
	CytoTox-Fluor™ (G9260)					
DCP	CytoTox-Fluor™ (G9260)	なし (内在マーカーの検出)	蛍光		◎	×
	CytoTox-Glo™ (G9290)					

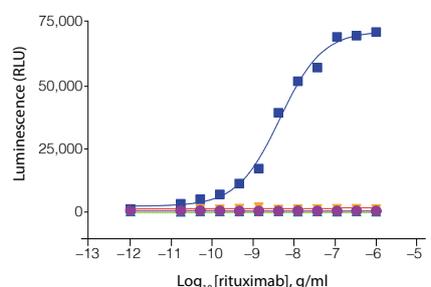
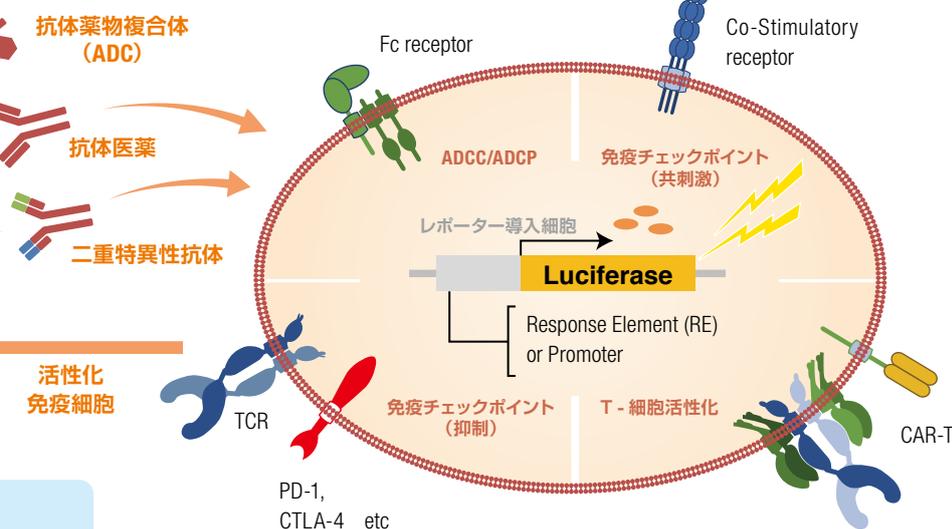
LDH: 乳酸脱水素酵素、DCP: Dead Cell Protease HaloTag® については 10 ページ、HiBiT 9 ページ、NanoBiT 12 ページをご覧ください。

* 製品番号が CS より始まるものは正式販売前の特別品です。製品の詳細については弊社テクニカルサービス部までお寄せください。

簡便性と正確性に優れたレポーターベースのエフェクター活性検出法 (スクリーニング・品質管理に最適)

抗体依存性細胞傷害 (ADCC)、抗体依存性細胞食作用 (ADCP)、免疫チェックポイント遮断などの作用機序を利用した抗体医薬の開発では、末梢血単核球 (PBMC)、NK 細胞、T 細胞などの初代細胞をエフェクター細胞、疾患組織由来細胞をターゲット細胞として使用していましたが、これらの初代細胞をベースとしたアッセイは、ドナーの違いや細胞培養の要件などにより大きなバラツキがあり、開発研究はもとより厳密さが要求される品質管理試験のクライテリアを満たすことは極めて難しいものでした。プロメガのバイオアッセイシリーズは各作用機序を有し、エフェクター活性をレポーターをベースとした発光活性に変換したシステムとして構築されており、より簡便、安定な測定データを得ることができます。また、製品には遺伝子改変されたエフェクター/ターゲット細胞も付属するため初代培養細胞を用意する手間も省くことができます。T 細胞活性化に対する抗 PD-1 および抗 TIGIT 免疫チェックポイント遮断抗体の相乗効果など (下グラフ参照) についても定量的に測定でき、ICH ガイドラインに従って設計された認定試験でも適切なアッセイ精度、正確さおよび直線性が得られます。

- Target cells, effector cells and specific antibody
- WIL2-S, Jurkat/NFAT-luc + FcγRIIIa, rituximab
 - No target cells
 - NO WIL2-S, Jurkat/NFAT-luc + FcγRIIIa, rituximab
 - ▲ WIL2-S, Jurkat/NFAT-luc (NO FcγRIIIa), rituximab
 - ▲ WIL2-S, NO Jurkat/NFAT-luc + FcγRIIIa, rituximab
 - ▼ WIL2-S, Jurkat/NFAT-luc + FcγRIIIa, NO rituximab
 - ▼ WIL2-S, Jurkat/NFAT-luc + FcγRIIIa, trastuzumab



特異性の高い ADCC レポーターバイオアッセイ

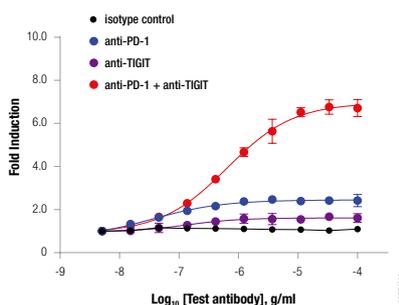
リツキシマブ、トラスツズマブ、コントロール培地 (抗体なし) の段階希釈系列をエフェクター細胞とともにターゲット細胞存在下あるいは非存在下で 37℃、6 時間インキュベートし、ルシフェラーゼ活性を定量した。

で検出
Cell

エフェクター細胞の活性検出 (免疫細胞)

PD-1 + TIGIT 併用バイオアッセイによる抗 PD-1 および抗 TIGIT 遮断抗体の相乗効果

PD-1 + TIGIT エフェクター細胞を、抗 PD-1、抗 TIGIT、または両方の遮断抗体の存在下で PD-L1 + CD155 aAPC 細胞とインキュベートし、ルシフェラーゼ活性を測定した。



簡便操作のバイオアッセイ (ビデオ)



より詳細については…



がん免疫研究サポート製品

活性化対照	作用機序	製品名 (製品番号)
	T 細胞活性化	T Cell Activation (J1621, J1651)
	免疫チェックポイント阻害	PD-1/PD-L1 (J1250), CTLA-4 (JA3001), TIGIT/CD155 (J2201), LAG-3/MHC-II (JA1111), TIM-3/CD28 (CS1978C07*), BTLA/HVEM 他
T 細胞活性化	免疫システムの活性化	4-1BB (JA2351), GITR, CD40 (JA2151), OX40, CD27, FcγRIIb 他
	コンビネーション	PD-1+CTLA-4 (CS1978D04*), PD-1+TIGIT (J2211), PD-1+LAG-3 (CS1978B11*), PD-1+4-1BB (CS1978I05*), PD-1+OX40
	遺伝子改変 T 細胞 (CAR-T)	T Cell Activation (J1631, J1601)
NK 細胞活性化	ADCC (ヒト FcγRIII, マウス FcγRIII or FcγRIV)	ヒト (V variant: G7014, G7015, G7010. F variant: G9790) マウス (FcγRIV: M1201, M1211. FcγRIII: お問合せ下さい)
マクロファージ活性化	ADCP	ADCP (FcγRIIIa, H variant: G9901, G9991. R variant, FcγRI: お問合せ下さい)
免疫細胞各種	サイトカイン・成長因子	IL-1, IL-2 (JA2201), IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15 (JA2011), IL-17, IL-23, VEGF (GA2001), RANKL, TGF-β, TNFα, INF, EPO

* 製品番号が GS より始まるものは正式販売前の特別品です。製品の詳細については弊社テクニカルサービス部までお寄せください。

* その他リコンビナント細胞の作製受託サービスについては弊社までお問合せください。

細胞死からの回避 vs 制御

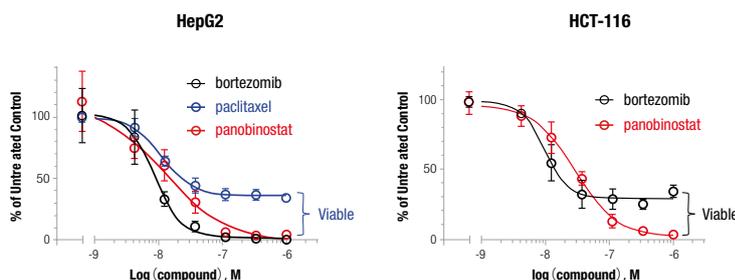
細胞死メカニズムの解析 ~マルチ・リアルタイム & 3D~

がん細胞は増殖を阻害する腫瘍抑制経路を回避し、老化やアポトーシスからも逃れることによって増殖を続けます。そのため、研究者はがんを治療するためにがん細胞の増殖を止めたりアポトーシスを起こさせてがん細胞を殺すための薬剤を探し続けています。また、オートファジーについてもがんの生存との関連が報告されており、オートファジーを標的とした創薬なども行われています。培養細胞を用いたリアルタイムアッセイは細胞の生存性、細胞毒性あるいはアポトーシスを継続的にモニタリングすることができるため、薬物治療で投与量や暴露時間を決定する上で大変役に立ちます。また、3D 培養系は2D 培養系に比べて腫瘍の微小環境をより正確に反映するため、抗がん剤開発におけるモデルとして重要視されています。また、複数のアッセイを組み合わせることで細胞死メカニズムに関する重要な情報を明らかにすることができます。例えば細胞がアポトーシスあるいはネクローシスのどちらにより死ぬのかを明らかにしたり、細胞死と細胞増殖阻害を見分けることもできます。CellTox™ Green とエンドポイントカパーゼアッセイ (Caspase-Glo®) あるいはリアルタイムアポトーシスアッセイ (RealTime Glo™ Annexin V Apoptosis Assay) と組み合わせれば、観察された細胞毒性がアポトーシスによるものかどうかを決定することができます。さらに、細胞毒性試験と発光または蛍光細胞生存試験との組み合わせで細胞毒性と細胞増殖阻害を見分けることもできます。



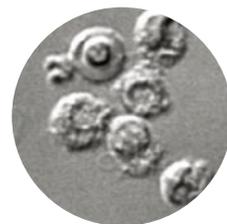
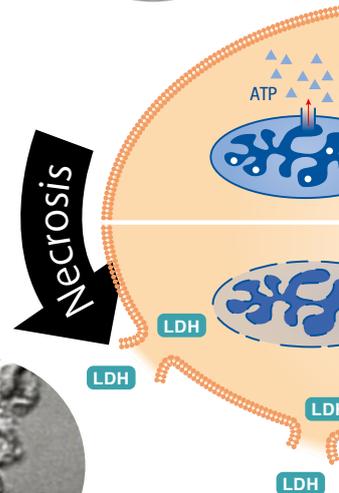
FLC 細胞生存試験による腫瘍残存 (Tumor Persistence) の評価

CellTiter-Glo® は細胞内の ATP に比例した発光を測定することにより生存細胞を測定します。3D 細胞用にファインチューニングされた CellTiter-Glo® 3D は細胞塊の中心にも試薬が浸透するための生細胞量を正確に測定することができます。



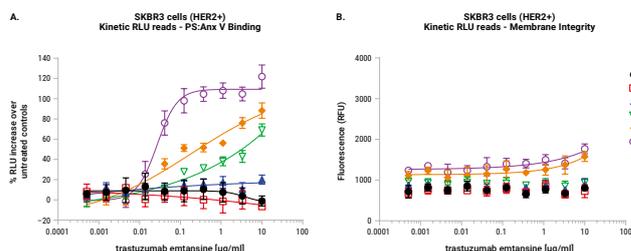
CellTiter-Glo® 3D による残存するがん細胞の検出

薬剤暴露後 48 時間後に処理したスフェロイドに CellTiter-Glo® 3D 試薬を添加した。インキュベーション 10 分後に ATP 由来する発光を測定した。パクリタキセルはボルテゾミブと同等の効力を示したがある程度の生細胞が残存した (左: HepG2 細胞)。ボルテゾミブはパノビノスタットよりも高い効力を示したが、完全な細胞毒性は示されなかった (右: HCT-116 細胞)。エンドポイントの細胞生存試験は細胞毒性の最大効果を明確にする上で有用。



NBT アポトーシス検出によるバイオリジクス試験

トラスツマブエムタンシンは FDA に認可された乳がん治療に用いられる抗体薬物複合体 (ADC) です。感受性がん細胞に過剰発現するヒト上皮成長因子 2 (HER2) 受容体に結合するモノクローナル抗体標的 (トラスツマブ) に毒性薬剤 (エムタンシン) を搭載して細胞内に侵入して破壊します。以下のデータでは、SKBR3 HER2+ 細胞をトラスツマブエムタンシンで処理し、RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay を用いて用量および時間依存的なアポトーシスおよび二次ネクローシスについて未処理コントロールと比較しています。薬剤投与 52 時間以上にわたりアポトーシスとネクローシスを高感度に検出することができます。(ベースとなる NanoBit® については 12 ページを参照)



RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay によるアポトーシスおよび二次ネクローシスの検出

SKBR3 HER2+ cells (10,000/well in 96-well plate) を抗体薬物複合体 (トラスツマブエムタンシン) で処理し、表示時間にアポトーシス [ホスファチジルセリン:アネキシン V 結合] (パネル A) およびネクローシス [細胞より漏出した DNA 蛍光染色] (パネル B) を検出した。

より詳細については...

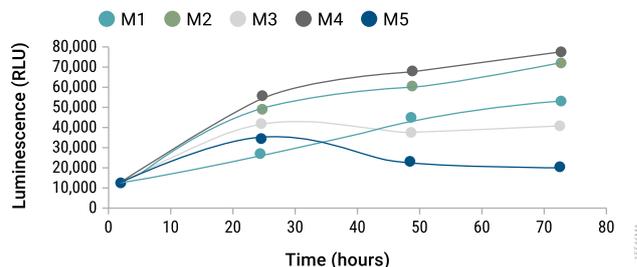


RealTime-Glo Annexin V のイメージング
promega.co.jp/go?19001

U2OS 細胞にスタウロスポリン (終濃度 1 μM) を添加し、アポトーシスを誘導した。発光イメージングシステム LV200 (Olympus) にてイメージングを行い、Annexin V の発光 (Blue) とネクローシスの蛍光 (Green) の像を重ね合わせた。<オリンパス社のご厚意によりデータ提供>

NLC 3D 細胞・オルガノイドを用いた細胞増殖の検出

3D 細胞モデルの使用は疾患メカニズムの理解、薬剤治療の開発のために徐々に増えています。そのプロセスには患者からのがんオルガノイドなどの 3D 培養から派生するものも含まれます。3D 培養は低分子薬剤のスクリーニングに使用でき、疾患パスウェイの理解にも役立ちます。3D 細胞培養系は 2D 培養系に比べてより正確に薬剤処理の有効性や毒性を予測することができます。プロメガの様々な細胞アッセイ試薬は 3D 細胞に対応できる柔軟性を備えています。



RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay による患者 P2 由来大腸癌オルガノイドの経時的な増殖

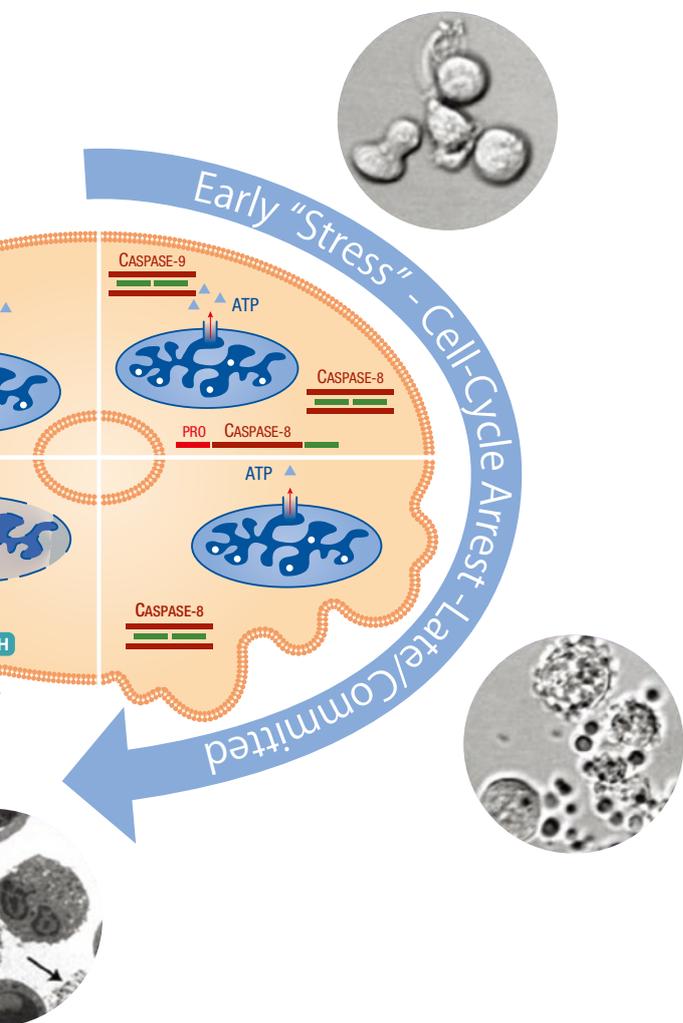
患者 P2 の 33,000 個癌細胞/ウェルを 5 つの異なる培地 (M1、M2、M3、M4 および M5) で 96 ウェルプレートに播種した。細胞生存率は、培養開始後 1、24、48 および 72 時間に RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay によってモニターした。RLU を M1 の 1 時間値に対して正規化した。培地 M1、M2、および M4 は十分な成長を示したが、M3 および M5 は劣っていた。

より詳細については…



3D 細胞培養入門

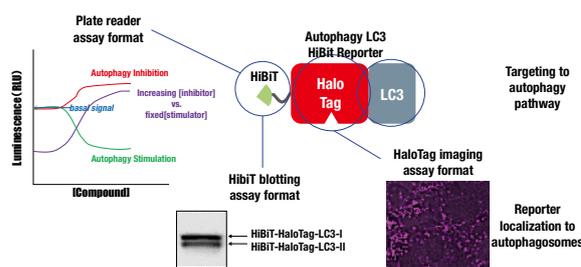
promega.jp/3dguide



HBT HTG オートファジー細胞死研究を加速させるレポーターセンサー

がんなど栄養制限によるストレスを受けた状態では、オルガネラを分解してこれらの細胞成分を生合成あるいはエネルギー代謝にリサイクルするためにオートファジーが誘導されます。オートファジーはがん細胞の様態に対して逆の作用を与えることもあり、アポトーシスからがんを防御する生存機構として働くことやアポトーシスを誘導してがん細胞を殺す場合もあります。

プロメガの Autophagy LC3 HiBiT System は、オートファジーマーカーである LC3 に HiBiT-HaloTag® モジュールを付加した融合タンパク質を発現させます。発光法による定量測定、タンパク質プロテティングの検出だけでなく、HaloTag® 技術を利用した生細胞蛍光イメージングも行え、3D 培養にも対応します。(HiBiT については 9 ページ、HaloTag® については 10 ページ参照)



Autophagy LC3 HiBiT Reporter System の概要

Autophagy LC3 HiBiT Reporter には発光タグ HiBiT と蛍光リガンドと特異的に結合する HaloTag® が融合されているため、アッセイ、ゲル分析、蛍光イメージングなど様々な分析が可能

細胞ベース生存性・毒性アッセイ試薬

製品名	サイズ	カタログ番号
アポトーシス		
RealTime Glo™ Annexin V Apoptosis Assay	100 回分	JA1000
RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay	100 回分	JA1011
Caspase-Glo® 3/7 Assay	2.5 ml	G8090
Caspase-Glo® 8 Assay	2.5 ml	G8200
Caspase-Glo® 9 Assay	2.5 ml	G8210

製品名	サイズ	カタログ番号
細胞生存性		
RealTime-Glo™ MT Cell Viability	100 回分	G9711
CellTiter-Glo® 2.0 Assay (2D 細胞用)	10 ml	G9241
CellTiter-Glo® 3D Cell Assay	10 ml	G9681
細胞毒性		
CellTox™ Green Cytotoxicity Assay	10 ml	G8741
オートファジー		
Autophagy LC3 HiBiT Reporter Vector and Detection System	1 kit	GA2550

がん細胞・免疫細胞の代謝変化を追え！ 細胞内代謝変化をプレートリーダーで測定

腫瘍微小環境中の細胞はエネルギーを奪い合う中で、生存性・機能性を維持するために代謝様式を変化させ、うまく適応しなければなりません。このような環境におけるがん細胞あるいは免疫細胞に関する代謝の要件や弱点を特定することは、より効果的な癌治療の開発に役立つ可能性があります。

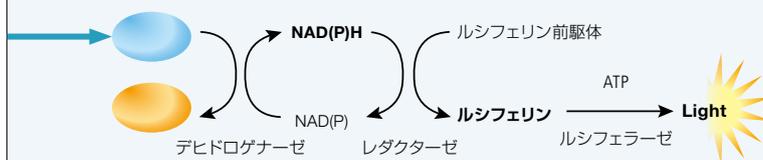
プロメガは、以下の重要な細胞代謝経路をモニタリングするための発光代謝アッセイを開発しました。グルコースによる解糖および乳酸の検出、グルタミンおよびグルタミン酸測定によるグルタミノリシス、グリセロールとトリグリセリド測定による脂肪分解と脂質生成などを調べることができます。アッセイは共通の NAD (P) H 生物発光検出技術を利用しており、細胞ライセート、培地、組織、血漿 / 血清など様々なサンプルタイプに適応します。感度が高いため極微量のサンプルからでも測定でき、同じサンプルから複数種類の代謝物を測定することや、経時的な測定を行うことも可能です (培地を使用した残りの細胞も他のアッセイに使用することもできます)。

ホタルルシフェラーゼ発光反応ベースの高感度アッセイ

FLC

- グルコース
- 乳酸
- グルタミン酸
- グルタミン
- トリグリセリド*
- グリセロール*
- コレステロール*
- コレステロールエステル*
- 分岐鎖アミノ酸 [パリン、ロイシン、イソロイシン] *
- グリコーゲン*

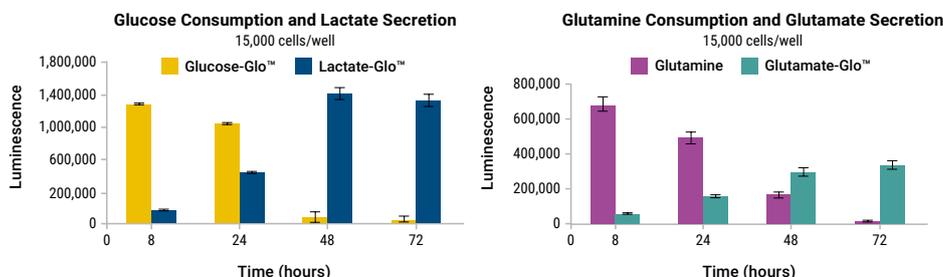
プロメガはこれまでにルシフェラーゼ発光反応を構成するルシフェラーゼ発光酵素、ルシフェリン、ATP を利用した生体分子の高感度アッセイを数多く開発してきました (CellTiter-Glo[®]、ADP-Glo[™]、Proteasome-Glo[™] など)。さらに、様々な酵素反応の補酵素である NAD (P) H をルシフェリンと結びつけることで、高感度な代謝物アッセイシリーズとして新たに加わりました。これらのアッセイ系は培地や細胞をサンプルとして使用できる汎用性も備えています。



*特注製品：開発中の特別注文品です。
ご興味のある方は弊社テクニカルサービス部までお問合せください。

グリコリシスからグルタミノリシス

がん細胞は成長のために酸素存在下でも主なエネルギー源として解糖系を利用する“好氣的解糖”を使うように自身のエネルギー代謝系をリプログラミングします。グリコリシス (解糖) はがんにおけるグルコースの消費と乳酸の分泌を、グルタミノリシスはグルタミンおよびグルタミン酸レベルを生細胞で分析することによりモニタリングすることができます。休止から増殖への代謝変化は乳酸の分泌および酸素の消費をともなうグルコースおよびグルタミンの取込量の増加で特徴づけられます。また、がん細胞では活性酸素種 (ROS) を蓄積することで酸化ストレスレベルが増大します。



同じサンプルから複数の代謝物を測定

表示の時間に A549 細胞の培地より各代謝物を Glucose-Glo[™] および Lactate-Glo[™] (パネル A)、Glutamine-Glo[™] および Glutamate-Glo[™] (パネル B) Assay を用いて測定した。

メタボローム解析受託

promega.co.jp/go?19017

公益財団法人かずさ DNA 研究所を委託業務実施機関としたメタボローム解析受託サービスを開始しました。ご興味のある方は弊社までお問合せください。

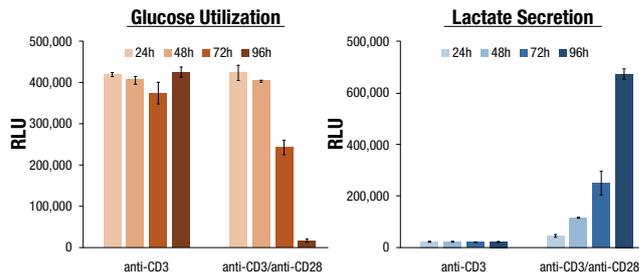


KGT
Kazusa Genome Technologies



T細胞活性化とグリコシスの誘導

プロメガの発光アッセイを用いて腫瘍細胞株およびT細胞の代謝活性を調べることができます。グリコシスへの切換えと乳酸分泌の経時的な増加をモニタリングすることによって、*in vitro*でのT細胞活性化とそのエネルギー源に関する研究に利用することができます。

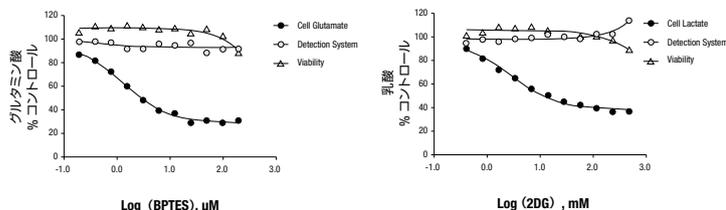


T細胞活性化にもなる代謝変化の検出

ヒト末梢血T細胞(5 mM グルコースおよび +/- 2 mM グルタミンを含む培地 100 μ l)に懸濁した細胞 250,000 個)を磁性体ビーズに固定した抗 CD3 および抗 CD28 抗体により活性化させた。培地サンプルを表示時間に分取してグルコースおよび乳酸の測定に使用した。

代謝経路阻害剤の迅速な解析

代謝経路は環境の変化に反応あるいは、酵素阻害剤などの低分子化合物によって変化します。以下の実験ではグルタミンナーゼ阻害剤 (BPTES) またはグリコシス経路の阻害剤 (2DG) 添加によるグルタミンおよび乳酸の急激な減少を検出しています。

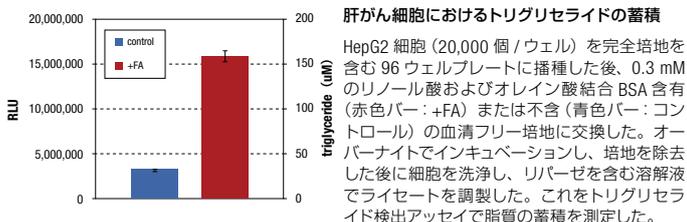


がん細胞における化合物添加による代謝変化の追跡

SKOV-3 卵巣がん細胞を 384 プレートで化合物とともに 37°C 1 時間インキュベートした後、各ウェルに直接グルタミン酸および乳酸検出試薬を添加した。乳酸またはグルタミン酸の減少は細胞生存性の低下 (RealTime-GloTM MT Cell Viability Assay) や検出試薬による干渉 (グルタミン酸または乳酸スタンダードで測定) によるものではなかった。

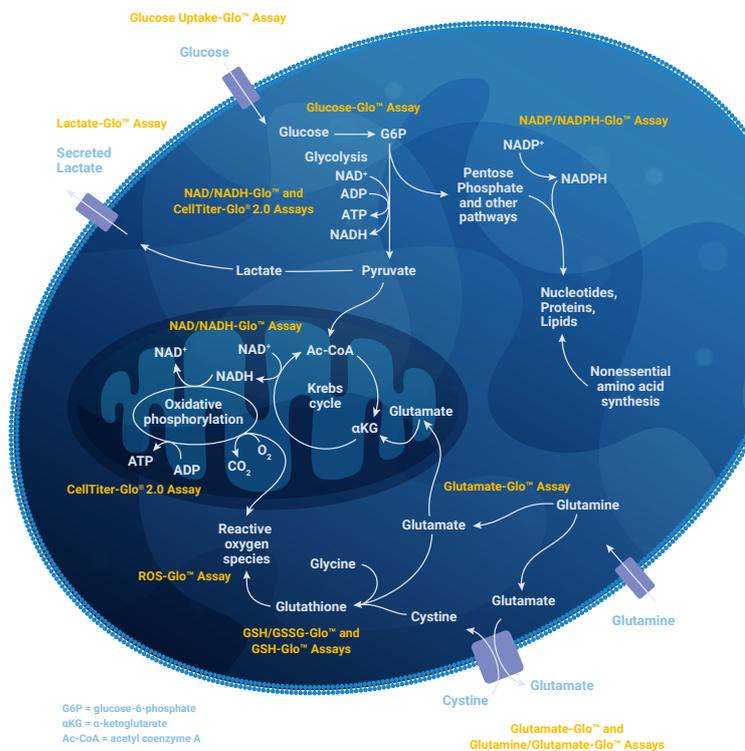
トリグリセライドの蓄積

トリグリセライドは細胞溶解した後トリグリセライドを消化してグリセロールを放出させることで測定することができます。リパーゼを含む非有機性溶解液を用いて 96 ウェルプレート中の細胞を直接溶解することができます。



肝がん細胞におけるトリグリセライドの蓄積

HepG2 細胞 (20,000 個 / ウェル) を完全培地を含む 96 ウェルプレートに播種した後、0.3 mM のリノール酸およびオレイン酸結合 BSA 含有 (赤色バー: +FA) または不含 (青色バー: コントロール) の血清フリー培地に交換した。オーバーナイトでインキュベーションし、培地を除去した後に細胞を洗浄し、リパーゼを含む溶解液でライセートを調製した。これをトリグリセライド検出アッセイで脂質の蓄積を測定した。



細胞ベース代謝アッセイ試薬

製品名	サイズ	カタログ番号
Glucose Uptake-Glo TM Assay	5 ml	J1341
Lactate-Glo TM Assay	5 ml	J5021
Glucose-Glo TM Assay	5 ml	J6021
Glutamate-Glo TM Assay	5 ml	J7021
Glutamine/Glutamate-Glo TM Assay	5 ml	J8021
BCAA-Glo TM Assay (分岐鎖アミノ酸)	-	CS306201*
Glycerol/Triglyceride-Glo	-	CS2061A01*
Cholesterol/Cholesterol ester Kit	-	CS2061A02*
ROS-Glo TM H ₂ O ₂ Assay	10 ml	G8820
GSH/GSSG-Glo TM Assay	10 ml	V6611
GSH-Glo TM Glutathione Assay	10 ml	V6911
NAD/NADH-Glo TM Assay	10 ml	G9071
NADP/NADPH-Glo TM Assay	10 ml	G9081

* 製品番号が CS より始まるものは正式販売前の特別品です。製品の詳細については弊社テクニカルサービス部までお寄せください。

より詳細については...



エネルギー代謝の変化

promega.jp/metab

より詳細については...



発光代謝アッセイ (論文)

promega.jp/lgggpd

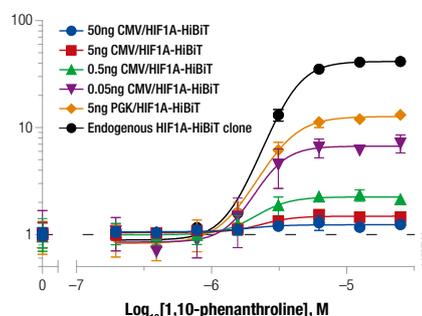
タンパク質安定化および転写活性を定量化 がんと低酸素応答



固形がんにも認められる低酸素環境はがんの悪性化などに関与することが明らかとなり、「環境標的治療」のターゲットとして有望視されています。中でも低酸素誘導因子 1A (HIF1A) は、細胞の低酸素環境への応答を制御する転写因子であり、血管新生、細胞生存、転移、グルコース代謝など、腫瘍形成のさまざまな側面に関与する遺伝子の発現を調節しています。また、その過剰発現または低酸素症による安定化は、がん患者の予後不良と関連付けられており、HIF1A とその関連経路はがん治療において注目されています。HIF はヘテロダイマーとして機能する転写因子であり、 α サブユニットである HIF- α は酸素濃度依存的に制御されています。プロメガの発光レポーターテクノロジーにより細胞内における HIF- α タンパク質の変化 (タンパク質レポーター) や HRE 低酸素応答配列による転写活性 (ジェネティックレポーター) をリアルタイムにモニタリングすることができます。特に NanoLuc[®] ルシフェラーゼをスプリットした HiBiT ペプチド (以下の「HiBiT テクノロジー」参照) は 11 アミノ酸であるためゲノム編集による内在性の標的遺伝子へのノックインが容易で、発現ベクター導入による過剰発現に比べてより生理的な応答性を得ることができます。

HiBiT によるタンパク質安定化の定量化

低酸素誘導因子-1A (HIF1A) のタンパク質レベルは、プロリン残基のヒドロキシル化と VHL によるユビキチン化により、通常の基底状態では低く保たれます。低酸素条件または 1, 10-フェナントロリンなどの化合物によるプロリルヒドロキシラーゼの阻害は、迅速に HIF1A タンパク質の蓄積を誘導します。HIF1A の蓄積は、一過性トランスフェクションを使用して CMV または PGK プロモーターを有するベクターから HIF1A-HiBiT 融合を発現させるか、CRISPR/Cas9 遺伝子編集を使用して内因性 HIF1A 遺伝子座に HiBiT を挿入することで測定しました (右図)。フェナントロリン添加量の増加に従って、HIF1A 量の用量反応性の増大が認められました。また、タンパク質発現レベルが低いほど蓄積の応答性が大きくなり、弱い PGK プロモーターからの発現と CRISPR / Cas9 挿入後の内因性発現の両方で最大の倍率変化を示すことも観察されました。(HiBiT については 9 ページをご覧ください)

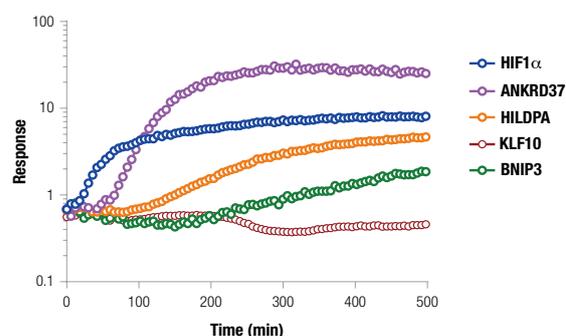


各発現コンストラクトによる HIF1A-HiBiT の応答性比較

HeLa 細胞に CMV または PGK プロモーターを含む HIF1A-HiBiT 発現コンストラクトを一過性にトランスフェクションまたは CRISPR/Cas9 により内在ローカスに HiBiT を導入し、1, 10-フェナントロリンによる応答性を調べた。

HiBiT による HIF1 α および下流の各種 HIF1A 誘導タンパク質のリアルタイム蓄積アッセイ

内因性 HIF1A または各種 HIF1A 誘導タンパク質 (BNIP3, ANKRD37, HILDPA, KLF10 など) 遺伝子の C 末端に CRISPR を用いて HiBiT タグを導入し、HIF1A シグナル伝達経路に対するフェナントロリンの影響を観察しました。タンパク質融合体の存在量の変化は、発光をモニターすることによりリアルタイムで追跡することができました。予想どおり、フェナントロリンの添加は HIF1A の蓄積を誘発しましたが、HIF1A の下流のターゲットは、それぞれ異なる応答性を示しました。このアッセイは、HIF1A のタンパク質レベルに対する化合物誘導効果、および HIF1A 誘導発現パターンの変化をスクリーニングすることができます。



HIF1 α および下流の各種 HIF1A 誘導タンパク質のリアルタイムアッセイ

ゲノム編集により内在 HIF1 α あるいは各標的タンパク質ローカスに HiBiT を組み込み、LgBiT を発現させるための BacMam-LgBiT も併せて HeLa 細胞に導入した。フェナントロリンを添加した後に経時的に発光を測定した。

HiBiT ベクター & 検出試薬

製品名	サイズ	カタログ番号
HiBiT 発現ベクター		
pFC37K HiBiT CMV-neo Flexi [®] Vector	20 μ g	N2391
pFN38K HiBiT CMV-neo Flexi [®] Vector	20 μ g	N2401
pFN39K secHiBiT CMV-neo Flexi [®] Vector	20 μ g	N2411
検出試薬		
Nano-Glo [®] HiBiT Blotting System	100 ml	N2410
Nano-Glo [®] HiBiT Extracellular Detection System	100 ml	N2421

※ CRISPR/Cas9 ゲノム編集による HiBiT 発光タグのノックイン受託および細胞株については弊社までお問い合わせください。

より詳細については…



CRISPR による HiBiT 導入法

promega.jp/crsp1pd

より詳細については…

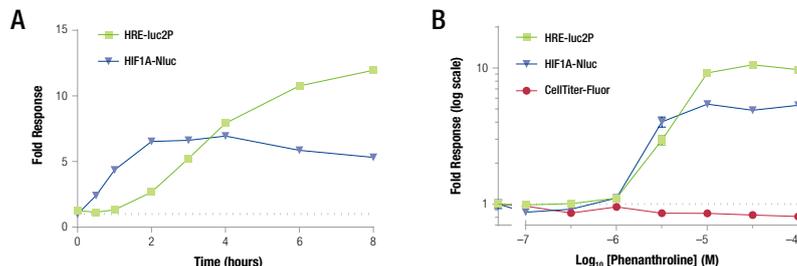


HiBiT のアプリケーション (文庫)

promega.co.jp/go?19002

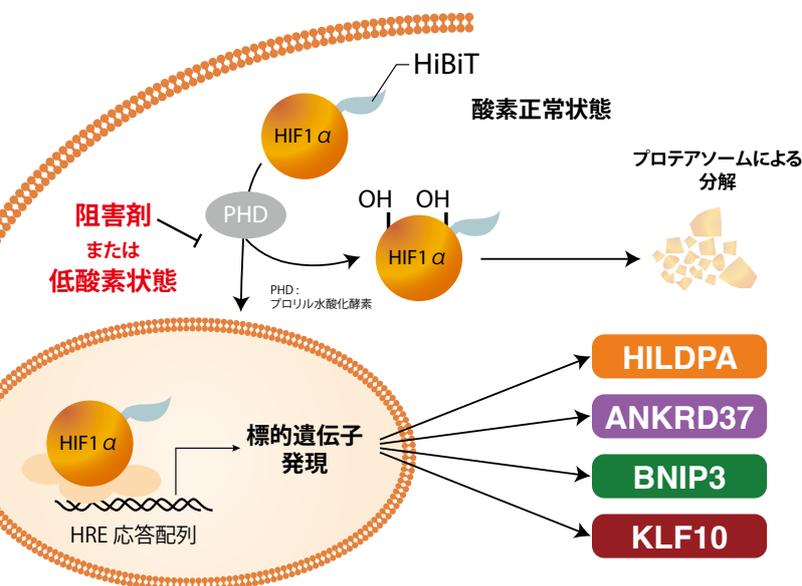
マルチアッセイによる低酸素応答の解析

細胞のストレス応答では、重要な調節タンパク質の安定性の変化、それに続く下流の転写調節をとまいません。多くの応答経路では、重要な転写因子の濃度および局在性は厳密に制御されています。Nano-Glo® Dual-Luciferase® Reporter Assay System は NanoLuc® ルシフェラーゼ (Nluc) およびホタルルシフェラーゼ (Fluc) を高感度に連続して測定することができるため標的タンパク質存在量 [NanoLuc®-HIF1A] および転写応答 (HRE) を同一サンプルより測定することができます。さらに第3の細胞情報として細胞生存マーカーも CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay で測定することで化合物の毒性などを補正した分析が可能になります。



フェナントロリンによる処理後の用量反応とタイムコース

HEK293 細胞に pNLF1-HIF1A [CMV/neo] Vector (カタログ番号 N1381) および pGL4.42 [luc2P/HRE/Hygro] Vector (カタログ番号 E4001) をコトランスフェクションした。100 μM フェナントロリンの添加後の経時的なレポーター測定値 (NanoDLR™ アッセイ (カタログ番号 N1610) を使用) を未処理細胞と比較した発光の倍率変化としてプロットした (パネル A)。細胞を CellTiter-Fluor™ 試薬 (カタログ番号 G6080) とともにインキュベートし、NanoDLR™ アッセイを行う前に蛍光を測定することにより、NanoDLR™ に細胞生存率測定を追加したマルチプレックスアッセイを実施した (パネル B)。

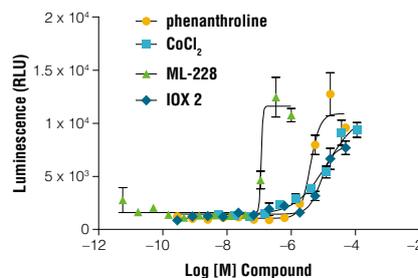


低酸素応答検出用レポーターシステム

製品名	サイズ	カタログ番号
レポーターベクター		
pNLF1-HIF1a [CMV/neo] Vector System	20 μg	N1381
pGL4.42 [luc2P/HRE/Hygro] Vector	20 μg	E4001
デュアルアッセイ試薬		
Nano-Glo® Dual-Luciferase® Reporter Assay	10 ml	N1610
細胞生存試験		
CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay	10 ml	G6080

iPS 由来細胞でのタンパク質安定性センサー使用例

NanoLuc® ルシフェラーゼは、高度な細胞モデルにおけるタンパク質安定性センサーのアプリケーションも可能にします。人工多能性幹細胞 (iPSC) 由来の心筋細胞は、虚血性疾患における HIF1A シグナル伝達を研究するための魅力的な細胞モデルです。HIF1A-NanoLuc® 融合タンパク質を一過性にトランスフェクトした iCell® 心筋細胞で、HIF1A レベルの誘導をモニターできます。IOX2、CoCl₂、ML-228、1, 10-フェナントロリンなどのプロリルヒドロキシラーゼ阻害剤は、わずか 3 時間の刺激で HIF1A-NanoLuc® タンパク質の用量依存的な増加をそれぞれ誘導しました。

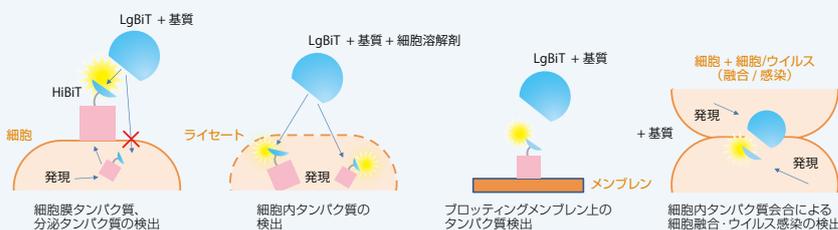


iPS 由来心筋細胞における低酸素応答レポーターの化合物による影響

播種 3 ~ 5 日後 iCell® Cardiomyocyte IC [pNLF1-HIF1A [CMV/neo] Vector [カタログ番号 N1381] を一過性にトランスフェクションした。トランスフェクション 24 時間後に表示の化合物で 3 時間処理し、Nano-Glo® Luciferase Assay (カタログ番号 N1110) を用いて発光を測定した。

HiBIT テクノロジー

互いに親和性の高い LgBIT (17.6 kDa) と HiBIT (11 アミノ酸) の各サブユニットが会合することにより NanoLuc® 発光酵素が形成されて生じたシグナルをタンパク質の検出に利用できます (右図参照)。特に HiBIT は分子量が小さいため、タンパク質タグとして利便性が非常に高く、ゲノム編集で内在遺伝子へ容易にノックインすることもできます。再会合した NanoLuc® はホタルルシフェラーゼの約 30 倍の発光強度を示すため、標的タンパク質を高感度に検出することができます。

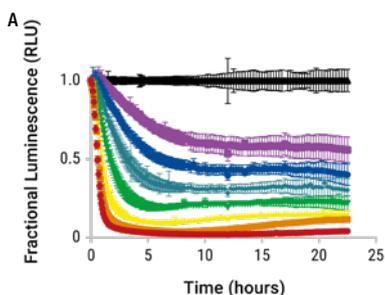


タンパク質ケミカルノックダウン 標的タンパク質を分解 ~ 阻害が無理なら消去! ~

ユビキチン-プロテアソーム系 (UPS) はオートファジーと並んで代表的なタンパク質分解系として挙げられます。がん細胞ではタンパク質分解系を阻害して異常タンパク質を蓄積させることにより細胞死を誘導することから、プロテアソーム阻害剤がすでに抗がん剤として使用されています。また最近では標的タンパク質を強制的にユビキチン化し、分解促進する PROTAC などの標的タンパク質特異的分解誘導薬に注目が集まっており、創薬ターゲットとして今非常に注目されています。しかし、細胞内で起こるタンパク質分解をハイスループットで、さらにはリアルタイムでモニターする優れたアッセイ系がありませんでした。プロメガの NanoLuc® テクノロジー (HiBiT や NanoBRET™ テクノロジーなど) は発光法や BRET 法により標的タンパク質の発現や分解、タンパク質相互作用を細胞内で観察できる理想的なプラットフォームで、リアルタイムにタンパク質分解動態や分解プロセスを仲介する UPS に関連する細胞内相互作用の測定に使用することができます。CRISPR ゲノム編集技術を用いて HiBiT (11 アミノ酸 発光タグ) を導入すれば、内在タンパク質の分解でも高感度に検出することができます。

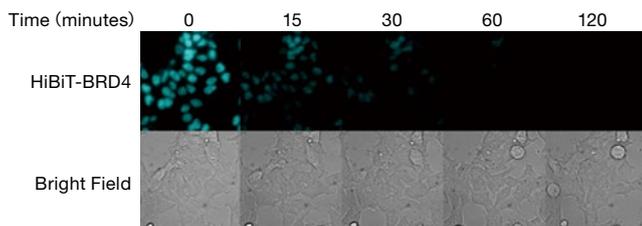
HiBiT & NanoBRET™ PPI テクノロジーによる分解経路の解析

PROTAC の開発には細胞内で起こるタンパク質分解までのイベントを正確に定量できるツールが不可欠です。それは、タンパク質分解という最終結果を見るだけでは、ユビキチン-プロテアソーム経路のどの段階で失敗したのかが分からず効率的な開発が困難になるからです。プロメガのテクノロジーを用いれば、多段階にわたる各ステップを定量的にとらえることができます。(HiBiT については 9 ページ、NanoBRET™ については本ページ下部参照)



内在性 HiBiT-BRD4 のカインティック分解アッセイ

LgBiT を安定発現する HEK293 に内在 HiBiT-BRD4 が発現するように CRISPR/Cas9 を用いてゲノム編集を行い、プレートに播種した。Nano-Glo® Endurazine™ Substrate (カタログ番号 N2570) を含む CO₂ 非依存性培地で 2.5 時間培養し、1 μM MZ1 PROTAC を加えた。各 PROTAC 濃度でのタンパク質分解を GloMax® Discover で発光測定 (パネル A)、Dmax (パネル B) を求めた。



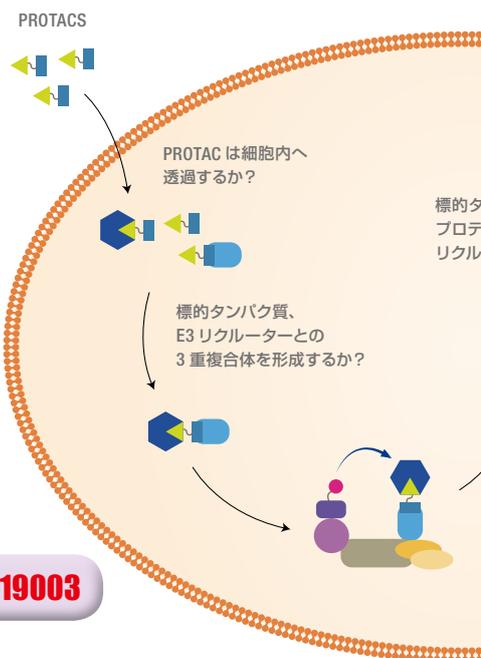
promega.co.jp/go?19003

HiBiT-BRD4 の発光分解イメージング (動画)

LgBiT 発現 HEK293 細胞の BRD4 内在遺伝子に HiBiT タグをゲノム編集にて導入し、1 μM MZ1 で 2 時間処理し、オリンパス社の LV200 で生物発光イメージングを行った。

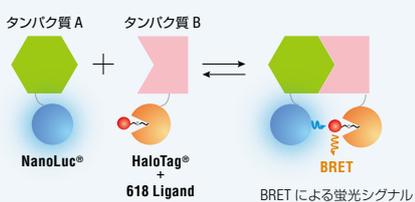
上記実験の関連製品については弊社までお問合せください。

タンパク質分解過程の? を解決



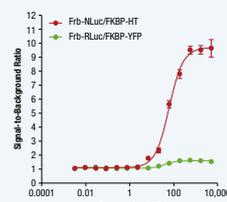
NanoBRET™ / HaloTag® テクノロジー

NanoBRET™ Assay は高レベル発光酵素 NanoLuc® ルシフェラーゼをエネルギー転移ドナー、HaloTag® NanoBRET™ 618 蛍光リガンドで標識された HaloTag® タンパク質をエネルギー転移アクセプターとして利用する BRET (生物発光共鳴エネルギー転移) ベースのアッセイで、生細胞内で 2 つのタンパク質の相互作用を測定することができます。従来の BRET に比べ優れたシグナル/バックグラウンド比が得られます。HaloTag® は低分子リガンドと特異的に結合する受け皿タンパク質で、蛍光イメージングやタンパク質精製のタグとしても使用できます。



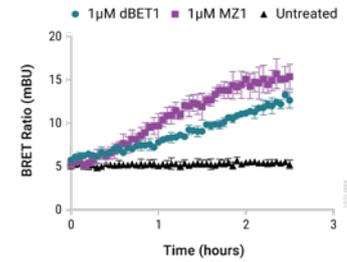
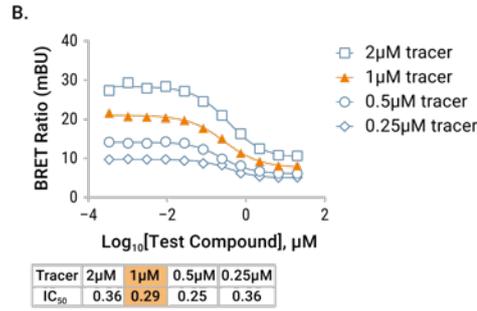
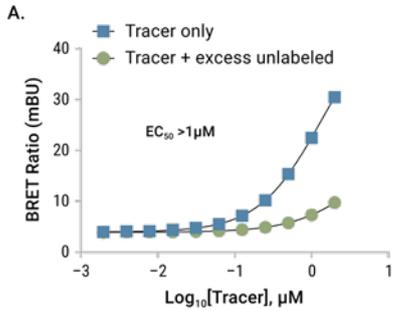
NanoBRET™ システムの原理

ベクターを導入した細胞内で発現したタンパク質 A: NanoLuc® (青色) 融合タンパク質と HaloTag® (オレンジ色) に低分子蛍光 618 リガンドが結合したタンパク質 B: HaloTag® 融合タンパク質が近接すると BRET が起こる。低分子蛍光 618 リガンドはタンパク質発現後に細胞へ添加する細胞透過性の蛍光試薬。



従来の BRET アッセイと NanoBRET™ のパフォーマンス比較

HaloTag® 618 Ligand が結合した FKBP-HaloTag® と FRB-NanoLuc® 存在下でラパマイシンを加えると 2 つの融合タンパク質が相互作用を起こし、BRET を生じる。FKBP-YFP と FRB-Rluc8 による BRET システムとのデータ比較



E3 リガーゼ (VHL) と化合物の結合を検出する NanoBRET™ ターゲットエンゲージメント (TE) アッセイ

VHL-NanoLuc® 融合タンパク質を一過性に発現する HEK293 細胞を 96 ウェルプレートに播種し、様々な濃度のトレーサーで処理した。細胞は飽和量の未標識の親化合物または非存在下でインキュベーションした (パネル A)。あるいは、未標識の親化合物の希釈系列を作成し 2 時間インキュベーションし、NanoBRET™ Nano-Glo® Substrate plus Extracellular NanoLuc® Inhibitor を添加した (パネル B)。BRET は 450/80BP および 610/LP フィルターを含むルミノメーターで測定した。VHL-NanoLuc に対する推奨トレーサー濃度はオレンジ色で示した (パネル B)。

ターゲットエンゲージメント (TE) アッセイの原理については 14 ページをご覧ください。

TE アッセイによる BRD4 コピキチン化の経時的モニタリング

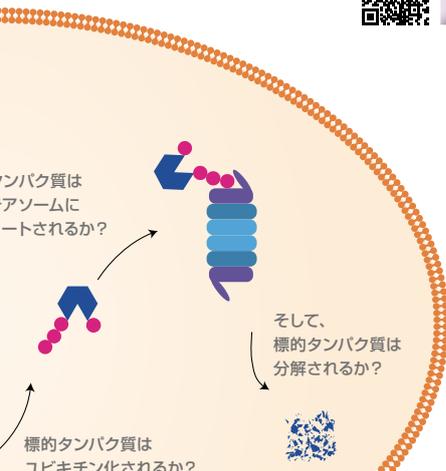
LgBit 安定発現 HEK293 細胞を HiBIT タグが付加された内在 BRD4 が発現するように CRISPR-Cas9 で改変し、6 ウェルプレートに播種し、HaloTag® -Ubiquitin acceptor plasmid をトランスフェクションした。HaloTag® NanoBRET™ 618 Ligand および Nano-Glo® Vivazine™ substrate を添加し、1 μM MZ1 または 1 μM dBET1 で処理した後に BRET を観察した。

より詳細については…



標的タンパク質の分解

promega.jp/prodeg



PROTAC 研究用 NanoBRET™ 関連製品

製品名	カタログ番号
NanoBRET™ BRD4/PSMD3 Interaction Assay	
NanoBRET™ cMyc/PSMD3 Interaction Assay	
NanoBRET™ β-catenin/PSMD3 Interaction Assay	
NanoBRET™ BRD4/Ub Interaction Assay	
NanoBRET™ β-catenin/Ub Interaction Assay	お問合せ下さい
NanoBRET™ BRD4/CRBN Interaction Assay	
NanoBRET™ BRD/VHL Interaction Assay	
NanoLuc® 融合ヒト E3 リガーゼクローン (約 300 種)	
HaloTag® 融合ヒト E3 リガーゼクローン (約 300 種)	

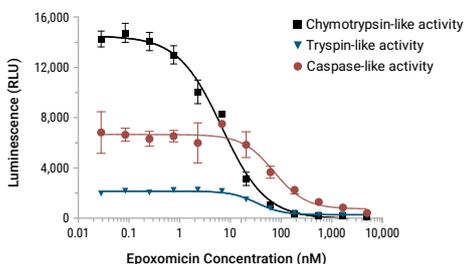
上記以外についても弊社までお問合せください。

ゲノム編集「HiBit ノックイン」受託サービス (CRISPR/Cas9)

HiBit、NanoLuc® あるいは HaloTag® をゲノム編集により内在遺伝子に導入するサービスを開始しました。ゲノム編集後の細胞プールあるいはシングルクローンとして提供可能です。すでに 300 種類以上のノックイン細胞を構築した実績と細胞種の実験などのコンサルティングにより成功率を高めます。詳細については弊社テクニカルサービスまでお寄せください。

FLC 細胞内プロテアソーム活性高感度測定

培養細胞内プロテアソーム複合体に関連したキモトリプシン様、トリプシン様、カスパーゼ様プロテアーゼ活性を測定するための発光ホモジニアスアッセイシステムで、生物学的関連性の高い結果を得ることができます。これらのアッセイは阻害剤ライブラリーのスクリーニングやプロテアソームにより制御されたタンパク質分解のモニタリングを細胞ベースで行うことができます。Proteasome-Glo™ Cell-Based Assay は細胞への透過性、プロテアソームおよびルシフェラーゼ活性に最適化されたバッファーと発光性のプロテアソーム基質 (ルシフェリン前駆体) が供給されます。“添加 - 混和 - 測定” フォーマットの Proteasome-Glo™ Cell-Based Reagent を細胞に加えると、プロテアソームによる基質の切断が起こり、続いてルシフェラーゼ反応により発光シグナルが直ちに生じます。



プロテアソーム阻害剤を用いたバイオアッセイ

U266 細胞 (5,000 個 / ウェル) を 384 ウェルプレートに播種し、37° C、5% CO₂ で 2.5 時間平衡化した。エポキシミンの希釈系列を培地で調整して各ウェルに添加し、2 時間インキュベーションした。Proteasome-Glo™ Cell-Based Reagent をウェルあたり 25 μl 添加し、15 分後に発光を測定した。

プロテアソーム細胞ベースアッセイ試薬

製品名	サイズ	カタログ番号
Proteasome-Glo™ 3-Substrate Cell-Based Assay System	10 ml	G1180
Proteasome-Glo™ Chymotrypsin-Like Cell-Based Assay	10 ml	G8660
Proteasome-Glo™ Trypsin-Like Cell-Based Assay	10 ml	G8760
Proteasome-Glo™ Caspase-Like Cell-Based Assay	10 ml	G8860

シグナルの変調①

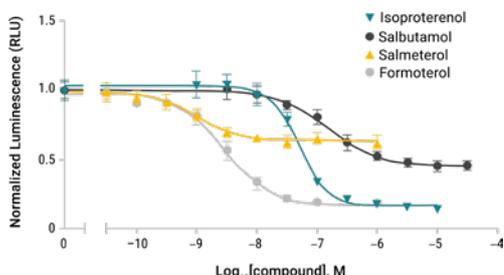
GPCR によるシグナルの異常

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は嗅覚、光感覚など様々な生体機能において重要な働きをしており、いくつかの GPCR ががん細胞に過剰発現して異常なシグナルの伝達が細胞のがん化に関わっていることが報告されています。また、GPCR の多くは生理活性物質をリガンドとしているため GPCR は創薬の重要な標的タンパク質となっています。現在まで開発された医薬品の中で 50% 程度は GPCR に作用する薬剤であり、これらのことから GPCR シグナルの調節機構を明らかにすることは、がんやその他の病気の効果的な治療薬の開発にとって非常に重要です。

HBIT NBR GPCR インターナリゼーション (HiBiT) GPCR-βアレスチン結合、GPCR 二量体化 (NanoBRET™ / NanoBiT®)

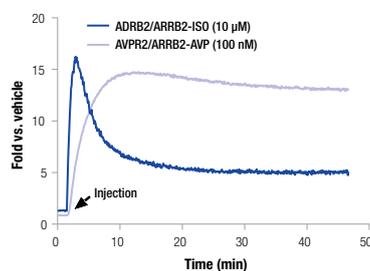
GPCR は細胞外の分子を検出し、G タンパク質と結合することによって内部シグナル伝達経路を活性化します。GPCR が活性化されると、β-アレスチンは細胞膜に移動して受容体に結合し、それを G タンパク質から切り離して内在化を促進します。GPCR の内在化を測定するために一般的に使用される ELISA 法では固定をする必要があり、操作が煩雑で GPCR の過剰発現も必要です。また、タグによる GPCR および関連タンパク質の動態研究も有用ですが、従来法ではタグが大きすぎて受容体本来の機能を乱す可能性があり、十分なシグナルを得ることも難しい場合が多々ありました。

プロモガの高感度で非常に小さい (11 アミノ酸) HiBiT 発光タグを付加できれば、アッセイに固定または洗浄工程を必要とせず、内在レベルの発現で十分なシグナルが得られ、タンパク質本来の機能を妨げる可能性は最低限です。(HiBiT については 9 ページ、NanoBiT® は本ページ下部、NanoBRET™ は 10 ページをご覧ください。)



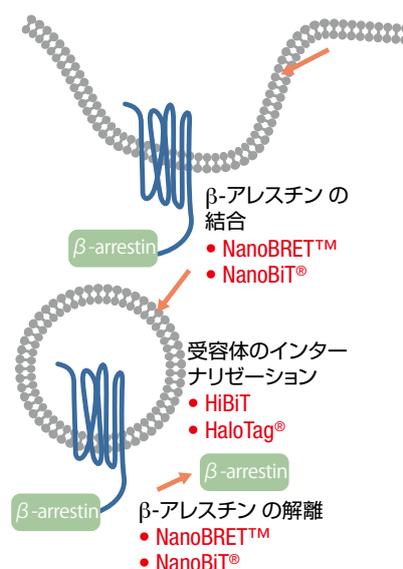
4 種のアゴニストによる HiBiT-ADRB2 受容体の
インターナリゼーションの測定

4 種類の完全または部分的アゴニストに暴露した際の β 2-adrenergic receptor (ADRB2) のインターナリゼーション測定



NanoBiT® による GPCR : β-アレスチンの相互作用モニタリング

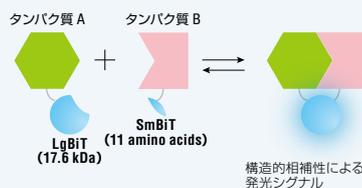
β-アドレナリン作動性受容体 (ADRB2) およびアルギニンバソプレシン受容体 (AVPR2) に対する β-アレスチン 2 (ARRB2) の結合を NanoBiT® で観察した。ADRB2 アゴニストであるイソプロテレノール (ISO) および AVPR2 アゴニスト Arg8-バソプレシン (AVP) でそれぞれを刺激前後の発光量を vehicle に対する比としてあらわした。



上記実験の関連製品については弊社までお問合せください。

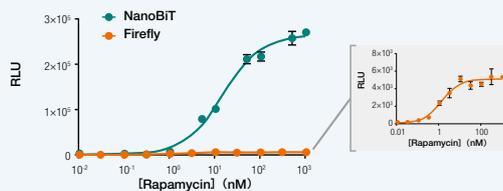
NanoBiT® テクノロジー

互いに親和性が極めて低い LgBiT と SmBiT の各サブユニットそれぞれに融合したタンパク質 A またはタンパク質 B が相互作用することにより NanoLuc® 発光酵素 (LgBiT + SmBiT) として再構成されて生じたシグナルをタンパク質間の相互作用検出に利用できます (右図参照)。ベクターやゲノム編集により細胞内に両サブユニットを導入して、タンパク質相互作用を高感度に検出することができます。



NanoBiT® システムの原理

ベクターを導入した細胞内で発現したタンパク質 A : LgBiT (青色の大きな断片) 融合タンパク質とタンパク質 B : SmBiT (青色の小さな断片) 融合タンパク質が結合すると発光酵素が再構成される。



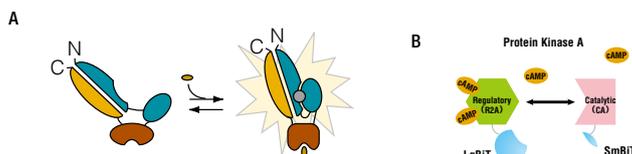
NanoBiT® とスプリットホタルシフェラーゼの応答性の比較

NanoBiT® タグまたはスプリットホタルシフェラーゼタグを融合した FKBP および FRB を発現する HEK293 細胞にラパマイシンを添加した。



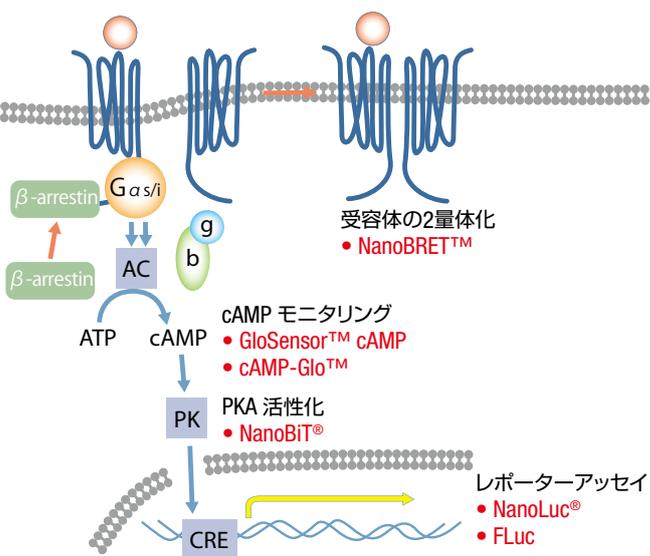
cAMP センサー

cAMP 結合ドメインを内蔵したルシフェラーゼ GloSensor™ cAMP を細胞内に導入することにより、細胞内の cAMP 濃度のダイナミクスを観察することができます。また、cAMP 増加にともなう PKA の活性化、すなわち PKA 触媒ドメイン (CA) からの調節ドメイン (R2A) の解離をタンパク質間相互作用検出ツール NanoBiT® で測定することもできます。



各 cAMP センサーの概要

A) GloSensor™ ではルシフェラーゼに組み込まれた cAMP 結合ドメインに cAMP が結合することにより、構造が変化してルシフェラーゼ活性を獲得。B) NanoBiT® センサーでは PKA 触媒ドメイン (CA) -SmBIT およびタイプ 2 調節ドメイン (R2A) -LgBIT 複合体が形成され、細胞内 cAMP の増加に伴い解離し、シグナルが低下 (このアッセイ系は、NanoBiT® PPI Starter System のコントロールアッセイとして付属)



より詳細については…

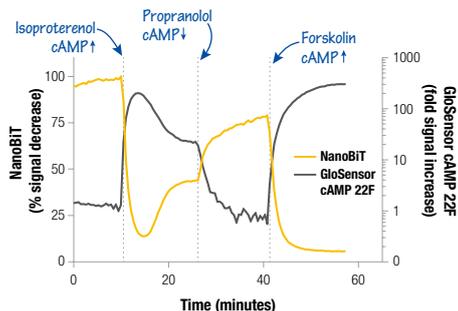


GPCR 研究ツール

promega.jp/gpcr

転写活性検出: レポーターアッセイによる転写応答性の検出

レポーターアッセイは機能的なシグナル経路の変化を捉える簡便なインジケータとして広く使用されます。NanoLuc® ルシフェラーゼはホタルルシフェラーゼの 100 倍の検出感度を誇り、従来のレポーター実験では検出できなかった微弱なシグナルを検出できる可能性があります。



cAMP 濃度変化のダイナミクスをモニタリングできる 2 種類のバイオセンサー

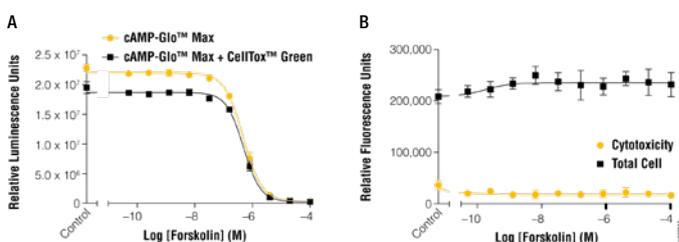
β 2-アドレナリン作動性受容体発現細胞に、GloSensor™ cAMP あるいは NanoBiT® (SmBIT-CA および LgBIT-R2A) を発現させ、アゴニスト (イソプロテレノール; ISO)、アンタゴニスト (プロプラノール; PRO)、アデニル酸シクラーゼアクティベーター (フォルスコリン; FSK) を順次添加した。NanoBiT® 反応の可逆性が観察されるとともに、GloSensor™ cAMP による細胞内 cAMP 濃度の変化と対称的なパターンを示した。

cAMP センサー & アッセイ

製品名	サイズ	カタログ番号
pGloSensor™ -22F cAMP Plasmid	20 µg	E2301
pGloSensor™ -20F cAMP Plasmid	20 µg	E1171
GloSensor™ cAMP Reagent	25 mg	E1290
NanoBiT® PPI MCS Starter System	1 システム	N2014
cAMP-Glo™ Max Assay	2 プレート分	V1681
CellTox™ Green Cytotoxicity Assay	10 ml	G8741

cAMP レベルと死細胞マルチアッセイ

cAMP-Glo™ Max Assay は細胞内の cAMP を発光シグナルとして測定するホモジニアスなハイスループットアッセイシステムです。このアッセイの原理は、cAMP がタンパク質キナーゼ A (PKA) ホロ酵素活性を刺激し、ルシフェラーゼ反応に利用可能な ATP が減少することにより発光が抑えられることに基きます。CellTox™ Green Cytotoxicity Assay とのマルチアッセイを行うことで、細胞毒性も同時に測定することができます。



cAMP と細胞毒性マルチアッセイ

パネル A. 段階希釈したフォルスコリンを細胞に添加し、CellTox™ Green Dye 存在下または非存在下で cAMP-Glo™ Max により cAMP 活性化をテストした (EC_{50} 値 $4.20-5.45 \times 10^{-7}$)。パネル B. 死細胞由来の漏出 DNA に結合した CellTox™ Green Dye の蛍光を cAMP-Glo™ Max 試薬添加前に測定し、細胞溶解後にトータルの DNA レベルとして再度測定した (EC_{50} 値 $4.13-5.76 \times 10^{-7}$)。

レポーターベクター

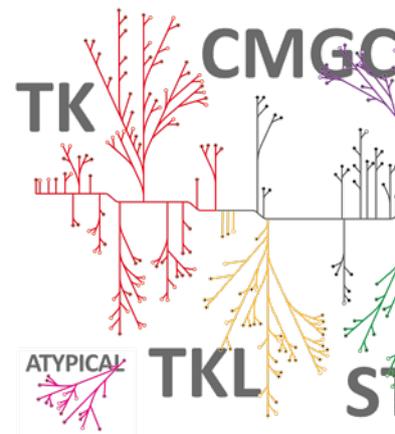
製品名	サイズ	カタログ番号
pNL [NlucP/CRE/Hygro] Vector	20 µg	CS186804 *
pNL [NlucP/SRE/Hygro] Vector	20 µg	CS177601 *
pNL [NlucP/AP1-RE/Hygro] Vector	20 µg	CS177603 *
pNL [NlucP/NFAT-RE/Hygro] Vector	20 µg	CS177602 *
pNL [NlucP/SRF/Hygro] Vector	20 µg	CS194101 *
pNL3.2 NF-kB-RE [NlucP/NF-kB-RE/Hygro]	20 µg	N1111
pNL [NlucP/TCF/LEF-RE/Hygro] Vector	20 µg	CS181801 *

* カタログ番号 "CS" から始まるものは特注品です。詳細については弊社までお問合せください。

シグナルの変調②

キナーゼの無秩序なシグナル

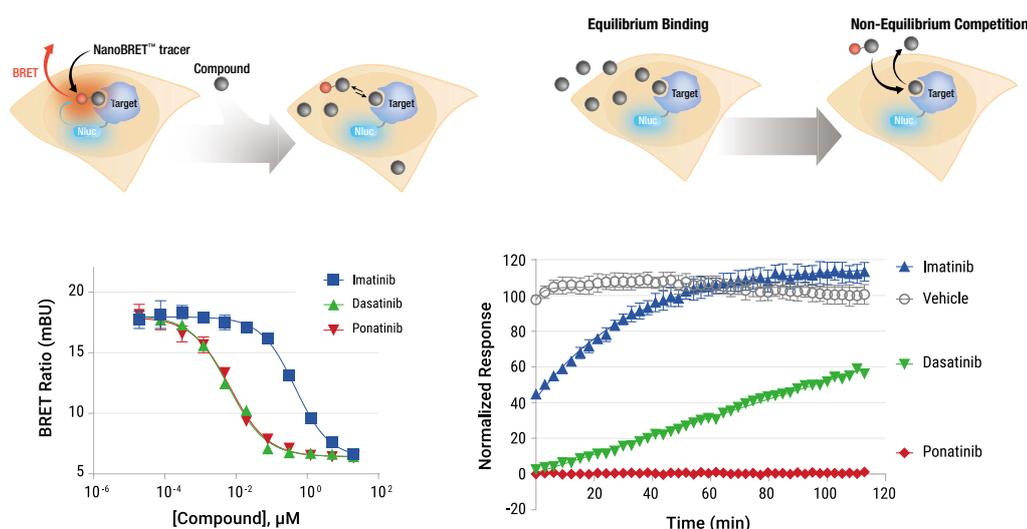
キナーゼはタンパク質や脂質のリン酸化を担う酵素で、細胞の増殖や機能の調節に深く関与しています。そのためキナーゼに異常をきたすと過剰なリン酸化などが起こり細胞が無秩序に増殖して癌を引き起こす原因になることが報告されています。これまでにキナーゼを標的とした抗がん剤(分子標的薬)が数多く開発されています。プロメガではあらゆるキナーゼ活性を *in vitro* で測定できるユニバーサルな ADP-Glo® アッセイや細胞内における標的キナーゼとテスト化合物の結合性を調べたり、ELISA 法に代わる洗浄操作が不要のリン酸化タンパク質の定量システムなどユニークなキナーゼ研究ツールを次々に開発しています。



NBR 細胞内キナーゼ：化合物相互作用検出(ターゲットエンゲージメント)：細胞内での真の結合性 & 滞留時間



薬剤の標的キナーゼ酵素への結合の選択性と親和性を理解することは、薬剤を評価するうえで重要なポイントとなります。従来は精製した標的分子を用いたセルフリー系が用いられてきましたが、生体内での環境と大きく異なり、必ずしも薬剤の実際の効果を反映しているとは言えませんでした。NanoBRET™ Target Engagement Assay は細胞内に発現した NanoLuc® ルシフェラーゼ-キナーゼ融合タンパク質と可逆的に結合する NanoBRET™ トレーサーのテスト化合物による競合的置換により見かけの親和性を測定することができます。(NanoBRET™ については 10 ページ参照)



キナーゼへの真の化合物結合性を明らかにする生細胞内での親和性および滞留時間の決定

NanoBRET™ TE ABL1 キナーゼアッセイと慢性骨髄性白血病(CML)を標的とした薬剤を使用した。第一世代 CML 薬イマチニブは ABL1 に対して第二世代薬(ダサチニブ)や第三世代薬(ポナチニブ)よりも弱い結合性と短い滞留時間を示した。ポナチニブはダサチニブと比べて同程度の親和性を有していたが、非常に長い滞留時間を示した。

低分子化合物 / キナーゼ相互作用アッセイ

製品名	サイズ	カタログ番号
NanoBRET™ Target Engagement Intracellular Kinase Assay, K-4	1 システム	N2520
NanoBRET™ Target Engagement Intracellular Kinase Assay, K-5	1 システム	N2500

各トレーサーに対応する NanoLuc® 融合標的タンパク質発現ベクターが別途必要です(右の QR コードよりベクターリスト参照)。

キナーゼ約 300 種に対応!

NanoLuc® ベクターについては...



Target Engagement 用ベクター

promega.jp/kinvect

NanoBRET™ Target Engagement 受託サービス

キナーゼに関する創薬に特化したカルナバイオサイエンス社でプロメガの NanoBRET™ 技術を利用したキナーゼ：阻害物質結合解析受託サービスを開始しました!

詳細については... promega.co.jp/go?19004

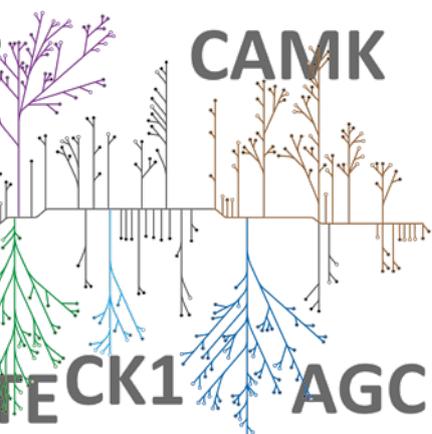


キナーゼ関連製品詳細については...



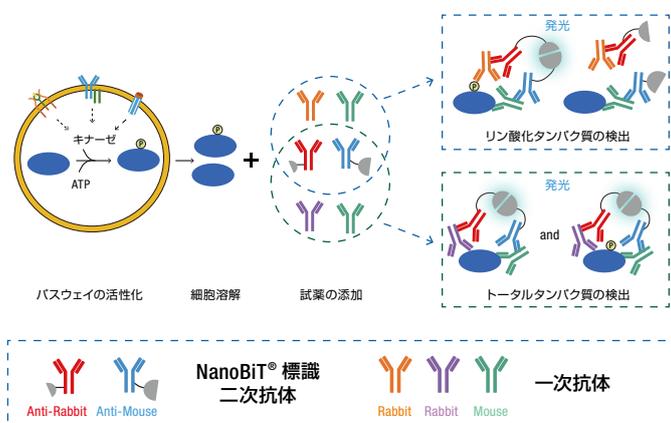
キナーゼ製品 ラインナップ

promega.jp/kinase2



リン酸化検出: 新規な細胞ベースの発光イムノアッセイ (洗わない ELISA)

遺伝子発現、酵素活性、タンパク質合成・転移などの細胞内応答は多様な細胞内シグナル経路の活性化を通じて調節されています。その中でも特定のキナーゼによる標的タンパク質のリン酸化は重要なノード(結節点)となり、上流の活性化イベントが下流の細胞応答へと受け渡されます。細胞ベースでこれらのシグナルイベントをモニタリングすることは正常な細胞のふるまいと疾患ステータスの理解に重要です。現在、タンパク質の検出や翻訳後修飾(例:リン酸化)分析ではELISAやウエスタンブロットなどのイムノアッセイが汎用されていますが、これらの方法は洗浄操作など非常に煩雑でハイスループットスクリーニングも困難です。プロメガのNanoBit® 発光アッセイ技術を用いたSmBiT/LgBiTで標識された1次/2次抗体を用いれば、洗浄操作(B/F分離)のいらぬ簡便で高感度なアッセイが行えます(NanoBit® について12ページ参照)。

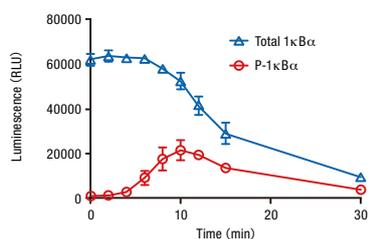


一次抗体検出用 LgBiT/SmBiT 標識二次抗体

製品名	サイズ	カタログ番号
NanoBit® Cell based (DIY) immunoassay	100 assay	CS1967A01*

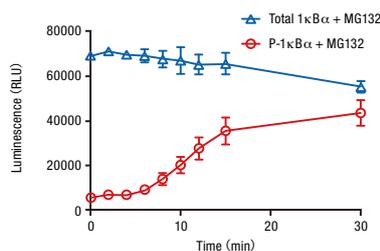
※ 一次抗体が別途必要です。

※ カタログ番号 "CS" から始まるものは特注品です。詳細については弊社までお問合せください。



<シンプルなプロトコール>

- 1 バスイェの活性化
- 2 細胞溶解
- 3 抗体ミックス添加
- 4 90 分間インキュベート
- 5 Nano-Glo® 試薬添加
- 6 発光測定



リン酸化およびトータル 1κBα 検出による NF-κB バスイェ活性化の検出とシンプルなプロトコール

MCF 細胞を TNF α で 0-30 分処理 (+/- MG132) した。プロテアソーム阻害剤により 1κBα の分解とリン酸化 1κBα の蓄積が検出された。

In Vitro キナーゼアッセイ

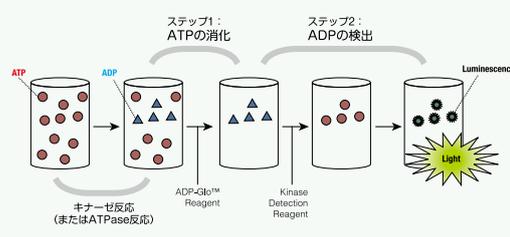
ADP-Glo™ Kinase Assay は、様々なキナーゼ反応で生成する ADP を発光法により測定する高感度なキナーゼアッセイシステムです(右図参照)。発光シグナルはキナーゼ活性と正の相関性を有します。このシステムは広範な精製キナーゼの活性に対する化合物の影響を測定する際に有効で、1次スクリーニングおよびキナーゼ選択性のプロファイリングにも利用することができます。また、ADP-Glo™ Kinase Assay は最大 1 mM ATP を使用して ADP を生成するあらゆる酵素(例:キナーゼ、ATPase)の活性をモニタリングすることができます。ADP-Glo™ Kinase Assay は広いダイナミックレンジを有し、低い ATP/ADP 変換率においても高いシグナルを生じるため、成長因子受容体チロシンキナーゼなど活性の低いキナーゼのスクリーニングにも最適です。

In Vitro 発光キナーゼアッセイ

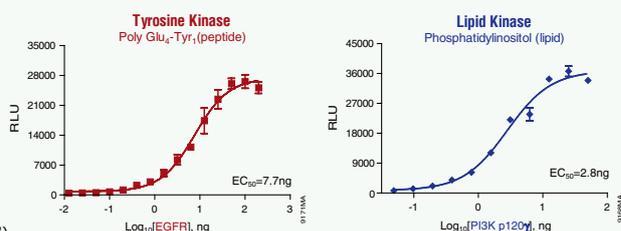
製品名	サイズ	カタログ番号
ADP-Glo™ Kinase Assay	400 回分	V6930

キナーゼ 379 種 (変異体 93 を含む) もご提供! (詳細については左ページの QR コード参照)

スクリーニングやプロファイリングも簡便に行えます!



ADP-Glo™ System の測定原理



様々なキナーゼ活性を検出できるユニバーサルな ADP-Glo™

エピジェネティック制御の変調

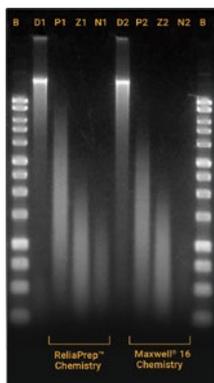
最新エピジェネティクス研究ツール ~ DNA メチル化からヒストン修飾 ~

がん細胞には遺伝子の異常だけでなくエピジェネティックな異常が存在し、この制御機構を解明することはがんの診断・治療につながると期待されます。

プロメガは、エピジェネティクス研究用に設計された試薬とアッセイのポートフォリオを提供しています。DNA 精製および定量キットからルシフェラーゼベースのアッセイやターゲットエンゲージメント用の BRET メソッドまで、プロメガの技術を駆使した新しいエピジェネティック研究ツールをお試しください。

DNA メチル化：バイサルファイト変換

MethylEdge® Bisulfite Conversion System は DNA の断片化を最小限に抑えながら 2 時間以内にバイサルファイト変換を行える迅速で効率的な方法です (変換 + 精製)。迅速なプロトコールと完全な変換により下流のアッセイに適した変換 DNA を最小限の労力と時間で取得することができます。プロメガの精製技術により MethylEdge® Bisulfite Conversion System は良質なバイサルファイト変換 DNA を取得することができます。



より詳細については…



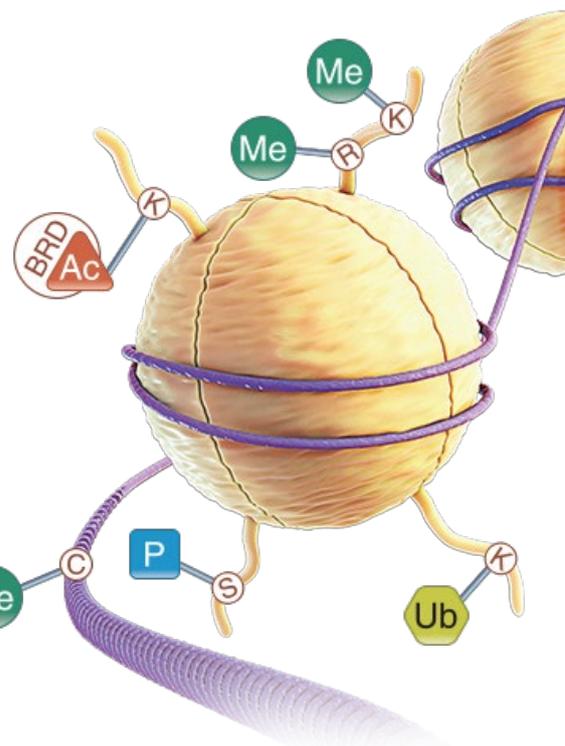
簡単! バイサルファイト変換 (動画)

promega.co.jp/go?19005

バイサルファイト変換

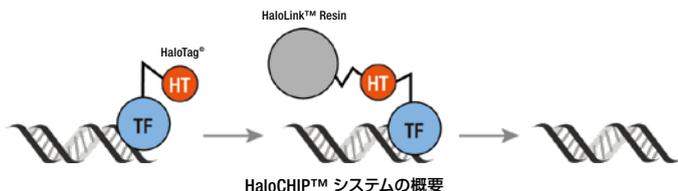
製品名	サイズ	カタログ番号
MethylEdge® Bisulfite Conversion System	50 回分	N1301
Methylated Human Control	5 µg	N1231
Converted Methylated Human Control	1 µg	N1221

Human Bisulfite-Seq (NGS) 解析受託については 21 ページへ



HTG クロマチン免疫沈降様アッセイ

HaloTag® リガンドと特異的に共有結合を形成する特殊な HaloTag® タンパク質を利用した新しいクロマチン免疫沈降 (ChIP) 様のシステムです。抗体を用いないため、従来法よりも効率的で安定したデータが得られます。ベクターを導入した細胞内で HaloTag® 融合体として発現した目的のタンパク質は、ホルムアルデヒドで DNA と架橋され、HaloTag® 部位と高い特異性で共有結合する HaloLink™ Resin 上に捕捉されます。強力な洗浄により非特異的に結合したタンパク質や DNA を除去した後、加熱処理により DNA と融合タンパク質間の架橋を外し、DNA 断片を回収します。



より詳細については…



抗体を用いない ChIP 様解析 (動画)

promega.co.jp/go?19006

クロマチン免疫沈降様アッセイ

製品名	サイズ	カタログ番号
HaloCHIP™ System	20 反応分	G9410
Flexi® HaloTag® Clone (ヒト ORF)	1 クローン	FHCxxxx

※ 約 18,000 種のヒト ORF を揃えた HaloTag® 導入クローンライブラリーよりお選びいただけます。詳細については www.promega.co.jp/flexiclone/ をご覧ください。

ChIP-Seq (NGS) 解析受託については 21 ページへ

NBR 細胞内プロモドメイン：ヒストン相互作用

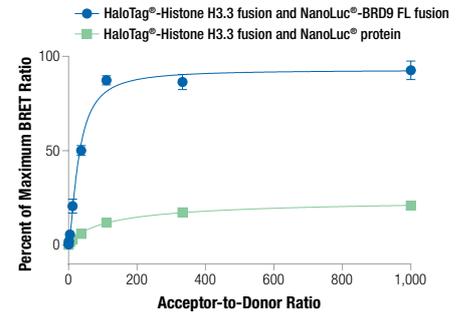
プロモドメイン (BRD) を含むタンパク質は核内タンパク質複合体の構成要素で、クロマチン修飾酵素のリクルートやアセチル化クロマチンの転写調節に関与しています。BRD を含むタンパク質とアセチル化ヒストンとのタンパク質間相互作用 (PPI) は細胞の健全性や分化に関連するエピジェネティックな調節に重要な役割を果たし、BRD の調節不全は疾患形成におけるイベントに関与するため薬剤標的として注目されています。

NanoBRET™ Bromodomain Interaction Assay は、生細胞内のクロマチンにおいて BRD を含むタンパク質と完全長のヒストンの相互作用研究を行うことができます。完全長の BRD タンパク質に加えて BRD 断片 (BRD4、BRD9 および BRPF1) も含まれており、ドメインのみの相互作用も理解することができます。

BRD/ヒストン相互作用アッセイ

製品名	サイズ	カタログ番号
NanoBRET™ BRD/Histone Interaction Assay 各種	1 システム	(例) N1830

BRD4、BRD9、BRPF1 と Histone H3.3 または H4 の組み合わせよりお選びいただけます。詳細およびカスタム品情報については promega.jp/nbretbrom をご覧ください。

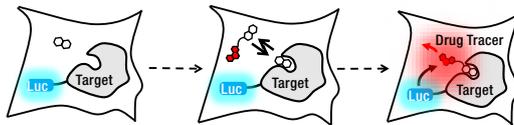


ヒストン H3.3 と BRD9 FL タンパク質相互作用検出のための Donor Saturation Assay (DSA)

アクセプター：ドナー (A:D) 比率を変えるために一定量の NanoLuc DNA (ドナー) とヒストン H3.3-HaloTag® Fusion Vector (アクセプター) を増量しながら HEK293 細胞にトランスフェクションした。完全長 (FL) BRD9 とヒストン 3.3 の相互作用を示した。ネガティブコントロールは NanoLuc® のみを含むサンプルセット

NBR 細胞内低分子化合物：HDAC/BET BRD 相互作用 (バインディングアッセイ)

NanoBRET™ Target Engagement (TE) Assay は生細胞内における標的タンパク質へのテスト化合物の結合を測定します。NanoBRET™ テクノロジーがベースとなっており、細胞内に発現した NanoLuc® - 標的タンパク質融合体に可逆的に結合した NanoBRET™ トレーサー (蛍光標識体) に対する競合的置換によりテスト化合物の見かけの親和性を分析します。標的タンパク質ごとに NanoLuc® 融合体およびトレーサーのセットをお選びいただけます。(NanoBRET™ については 10 ページ参照)



低分子化合物 /HDAC/BET/BRD 相互作用アッセイ

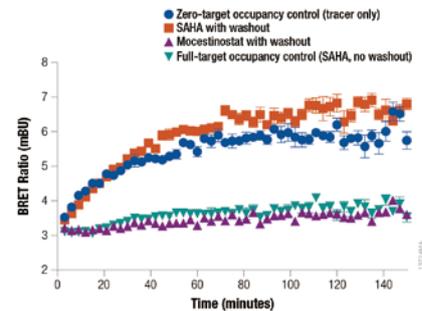
製品名	サイズ	カタログ番号
NanoBRET™ Target Engagement HDAC Assay 各種	1 システム	(例) N2080

アッセイ試薬、各種 HDAC 発現ベクターの組み合わせなどがございます。詳細およびカスタム品情報については promega.jp/nbrettehd をご覧ください。

製品名	サイズ	カタログ番号
NanoBRET™ Target Engagement BET BRD Assay 各種	1 システム	(例) N2130

アッセイ試薬、各種 BET BRD 発現ベクターの組み合わせなどがございます。詳細およびカスタム品情報については promega.jp/nbrettebb をご覧ください。

細胞内 BRD タンパク質分解アッセイについては 11 ページへ



HDAC1-NanoLuc® 融合タンパク質を一過性に発現する HeLa 細胞における化合物のレジデンスタイム (滞留時間) の解析

HDAC1-NanoLuc® FL 融合タンパク質を発現する細胞を 10 μM SAHA または 10 μM Micestinostat 存在下で 2 時間インキュベートした。化合物を除去した後 96 ウェルプレートに播種し、各 NanoBRET™ 試薬を添加した後、GloMax® Discover で BRET を測定した。

FLC 細胞内 HDAC 活性の測定

HDAC-Glo™ Assay は、1 回の試薬添加だけで操作が完了するホモジニアスな発光アッセイシステムで、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) クラス I/II、IIa およびクラス I 酵素 2 の相対的な酵素活性を細胞、抽出液、精製酵素などのサンプルソースより測定することができます。生細胞透過性の発光性アセチル化ペプチド基質を使用し、これが HDAC 活性により脱アセチル化され、試薬に含まれるプロテアーゼ消化で遊離したアミノルシフェリンを定量するための Ultra-Glo™ 組換えホタルルシフェラーゼによる発光反応の運動により測定することができます。

発光 HDAC アッセイ

製品名	サイズ	カタログ番号
HDAC-Glo™ I/II Assay	10 ml	G6420
HDAC-Glo™ I/II Screen System	10 ml	G6430
HDAC-Glo™ Class IIa Assay	10 ml	G9560
HDAC-Glo™ 2 Assay	10 ml	G9590

In Vitro メチル基転移酵素・脱メチル化酵素アッセイ

MTase-Glo™ Methyltransferase Assay は、メチルトランスフェラーゼ反応により生じた S-アデノシルホモシステイン (SAH) を ATP に変換し、ルシフェラーゼ反応からの光を測定します。実質的にあらゆるメチル基転移酵素で使用可能で、基質を修飾する必要もありません。

Succinate-Glo™ JmjC Demethylase/Hydroxylase Assay は JumonjiC ヒストン脱メチル化酵素および Fe(II)/α-ケトグルタル酸依存性デオキシゲナーゼ反応より生成するコハク酸を迅速に検出します。本アッセイでは反応産物のコハク酸を ATP に変換することでルシフェラーゼ反応による発光を生じ、この発光シグナルは基になる脱メチル化酵素 / 水酸化酵素活性に比例します。

発光 メチル基転移酵素・脱メチル化酵素アッセイ

製品名	サイズ	カタログ番号
MTase-Glo™ Methyltransferase Assay	400 回分	V7601
Succinate-Glo™ JmjC Demethylase/Hydroxylase Assay	1000 回分	V7990

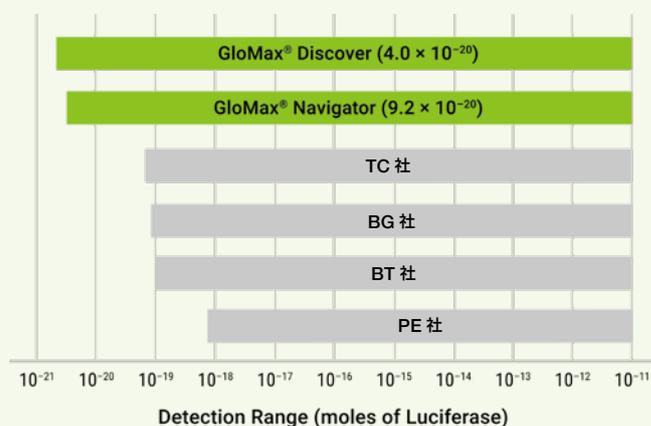
最高のアッセイにふさわしい測定装置 GloMax®

プレートリーダーで測定できる主な検出シグナルとして、発光、蛍光、および吸光が挙げられ、プロメガは生体分子の挙動をより正確にとらえるための測定法として最も高感度な発光法にこだわっています。例えば、酵素活性を測定する場合、検出感度が低いと生体内での濃度をはるかに超えた量の基質酵素または触媒を用いる必要があります。細胞アッセイでは検出感度に合わせて標的遺伝子を過剰発現させてその挙動を観察する場合、関わり合う生体分子間の存在比率を大きく逸脱し、正確に生理現象をとらえていることが困難になります。実際、CMV プロモーターでタンパク質を過剰発現させるのに対して、ゲノム編集を行い内在プロモーターを利用することで生理レベルの発現が得られ、より応答性が高く生物学的に関連性のあるデータが得られる実例もあります（下グラフ参照）。一方、ウェル間のクロストークは隣接する強シグナルのウェルから低 / 無シグナルのウェルへの光の漏れ込みにより正しい測定値の差がマスクされてしまいます。

プロメガの発光アッセイ試薬は非常に高感度で広いダイナミックレンジを有しているために細胞数の減少、転写レベルの低下、分子間相互作用などのより微妙な変化を捉えることができます。試薬のパフォーマンスを十分に発揮させるには、それに適応する検出装置を使用することが重要です。プロメガの GloMax® は優れた検出器とデュアルマスキングシステムなどが発光測定に最適化されており、最高の“感度”と最小限の“クロストーク”で最高のアッセイをお約束いたします。



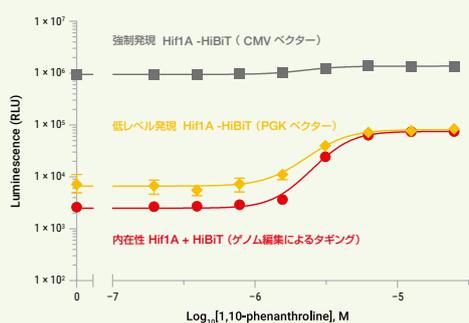
GloMax® Discover



Detection Range (moles of Luciferase)

GloMax® システムおよびその他市販のプレートリーダーの発光検出感度の比較

各検出装置の感度テストを行うために Bio-Glo™ Luciferase Assay System を使用し、検出限界 (LOD) を算出した。GloMax® Discover および Navigator は最も低い検出限界 ($<10^{-19}$ moles ルシフェラーゼ) を示した。



これまでの検出
強制的に発現させて、
低い応答性 (変化量) をなんとか検出
重要な変化を見落としがち

プロメガの 超高感度検出システム
(試薬 + 検出装置) なら
生体内と同等の低レベルで発現させて、
高い応答性 (変化量) をしっかり検出
重要な変化をキャッチ

フェナントロリンによる HIF1 α-HiBIT の安定性評価

CMV あるいは TK プロモーターを利用して HIF1 α-HiBIT を細胞内に一過性発現あるいはゲノム編集による内在性 HIF1 への HiBIT タグ付けにより発現させ、フェナントロリンによるタンパク質安定性を発光検出により評価した。ゲノム編集により本来の遺伝子ローカスに発光タグ (HiBIT) を導入することで、過剰発現させた場合よりも薬剤による応答性が飛躍的に向上しました。これは細胞内のタンパク質と内在性レベルで発現するタグ付加タンパク質が適切な化学量論的比率で維持されるのが一因であると推察されます。

GloMax レンタルサービスもご利用ください!



「機器がないから…」大丈夫です、ご相談ください!

RentaMAX / MAX れんたるは、プロメガのルミノメーター / 核酸自動精製装置を無償 / 有償で一定期間お貸出しするプログラムで、試薬 / 機器の両面からのサポート・コンサルティングも行います。

* アプリケーションによっては機器で使用する試薬を予めご購入いただく必要がございます。また、本サービスのご利用にはプロメガクラブ (無償) へのご入会が必要です。

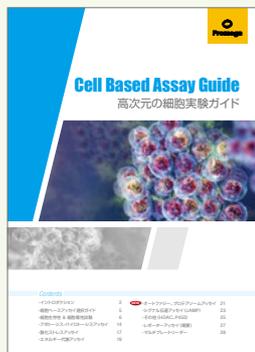
より詳細については…



RentaMAX のお申込みはこちら

promega.co.jp/rentamax/

ルミノメーター関連試薬・機器ガイド



promega.co.jp/go?19008



Cell Based Assay Guide

培養細胞を用いたアッセイシステムに関するプロダクトガイド。細胞増殖 / 毒性試験、アポトーシスアッセイ、細胞の状態（レドックス、エネルギー代謝、薬剤代謝）等を高感度に測定する発光アッセイ試薬をご紹介します。



promega.co.jp/go?19010



タンパク質レポーターテクノロジーガイド

ペプチドルシフェラーゼ HiBIT など最先端の NanoLuc® テクノロジーおよび多機能性 HaloTag® タグを利用した広範なタンパク質機能解析アプリケーション・ツールをご紹介します！

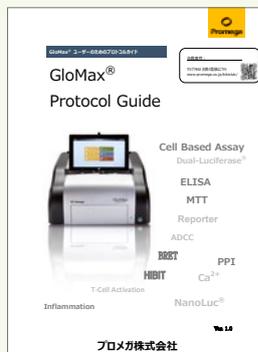


promega.co.jp/go?19012



発光レポーターガイド

最新の NanoLuc® ルシフェラーゼを用いたデュアルアッセイなどレポーター遺伝子を利用した発光アプリケーションや実験の手順などを説明。



promega.co.jp/go?19009



GloMax® Protocol Guide

門外不出の GloMax ユーザー専用ガイド。好評によりプレートリーダーで利用のすべて研究者におとどけいたします。各種アッセイ法・試薬をご紹介しますし、簡略化したプロトコルやアッセイの特長が記載され、アッセイの流れや概要を理解するために最適の1冊。



promega.co.jp/go?19011



機器カタログ

発光アッセイ試薬の性能を最大限に引き出すルミノメーターと、難しいサンプルからでもゲノム DNA、セルフリー DNA、Total RNA、miRNAなどを抽出できる自動精製装置のカタログ。試薬と機器をトータルでサポート。

バイオマーカー探索 分子マーカー探索 ~ miRNA、ccfDNA、エクソソーム ~

バイオマーカーはがんのリスクや組織内に存在する腫瘍の存在を検知するために使用されます。それらは腫瘍の増殖を助長する分子メカニズムを反映しているため、治療方針の決定に利用することも可能です。中でも血液や尿など低侵襲なサンプルから診断を行うリキッドバイオプシーは有望であり、含まれる標的分子には miRNA、ccfDNA、エクソソーム、タンパク質、代謝産物などがあります。また、近年では腸内フローラ（細菌叢）と病気の関連性が明らかになってきており、がんにおいてもバイオマーカーとして診断への応用が期待されています。遺伝子発現研究、特に次世代シーケンシングの進歩によってマーカー探索研究は加速しています。癌の早期発見を助け、個別化された治療法の選択肢について予測できる診断アッセイの開発が進められています。



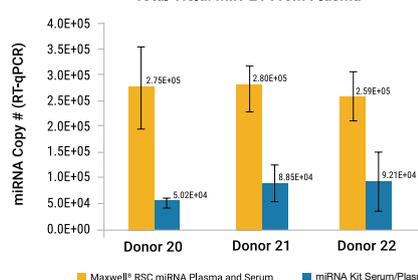
PM miRNA 自動精製

Maxwell® RSC miRNA Tissue Kit および miRNA Plasma and Serum Kit はどちらも Maxwell® RSC および RSC 48 自動精製装置で使用できます (Maxwell® RSC Instrument は 1~16 サンプルを、Maxwell® RSC 48 は 1~48 サンプルを一度に処理することができます)。Tissue Kit は哺乳動物組織から、Plasma and Serum Kit は血漿、血清または濃縮エクソソームからの miRNA を含む Total RNA を精製します。

抽出された RNA は非常に濃縮されているためバイオマーカー検出、遺伝子発現などの実験で利用される RT-qPCR や RNA シークエンシングやその他の用途にそのまま使用することができます。

miRNA-Seq (NGS) 解析受託については右ページへ

Total Yield: miR-21 From Plasma



血漿からの miRNA 自動精製

Maxwell® RSC miRNA Plasma and Serum Kit または他社 miRNA 精製キット (Q 社) を用いて、血漿 200 µl より精製した miR-21 収量を比較した。

PM ccfDNA 自動精製

循環セルフリー DNA (ccfDNA) はサンプル中に低濃度にしか含まれておらず、高度に断片化されているため精製は非常に困難です。さらに、サンプルの種類に起因する含有量の変動、および高レベルの gDNA 混入により微量成分である ccfDNA から低レベルの変異を検出することはさらに難しいチャレンジです。Maxwell® RSC ccfDNA Plasma Kit は Maxwell® RSC Instrument を用いてヒト血漿サンプルより ccfDNA を効率的に自動精製するための試薬カートリッジを含むキットです。精製装置は 0.2 - 1 ml の血漿サンプルを約 70 分で処理することができ、精製した DNA は PCR など様々な用途にそのまま使用することができます。また、ProNex® サイズ選択的精製システム (マニュアル法) などの磁気ビーズに基づくサイズ選択方法を使用して、サンプル中の ccfDNA 成分を濃縮することができます。

より詳細については…



バイオマーカー探索
promega.jp/biomarker

より詳細については…



ccfDNA 濃縮
promega.jp/pronexss

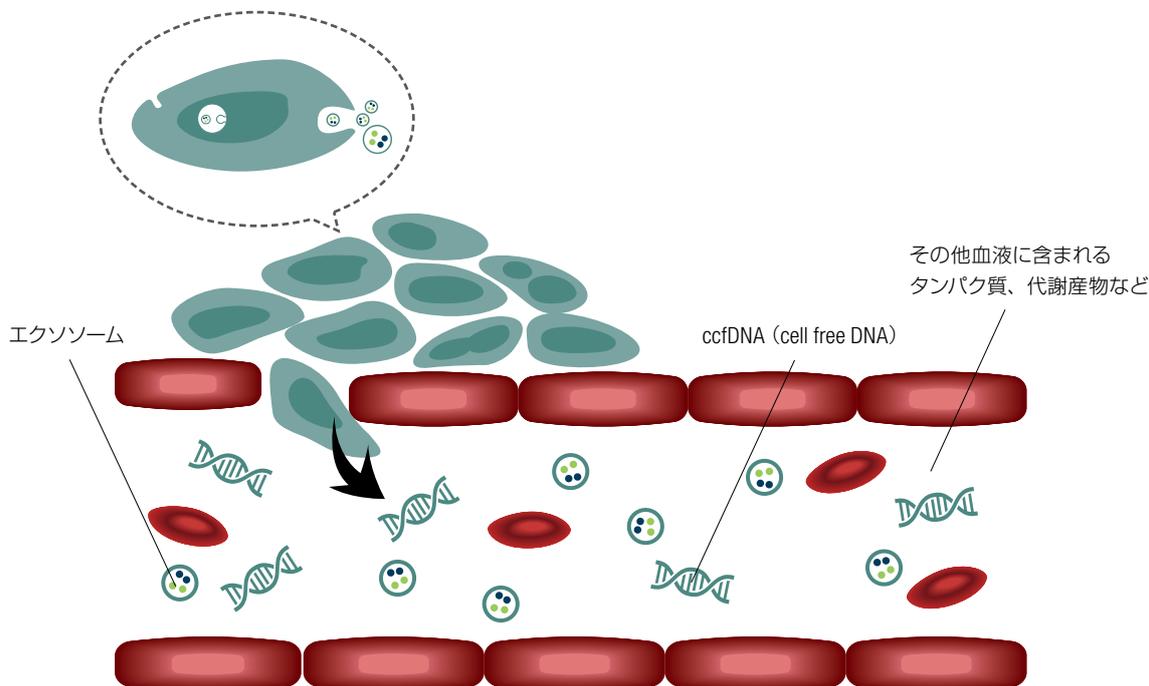


Maxwell® RSC 48 (カタログ番号 AS8500)

卓上に設置できるパーソナル自動核酸精製装置です。磁性体ビーズのムービングプログラム、パッファーなどは容易に多検体処理装置に適合させることができます。(23 ページ参照)

自動核酸精製装置 Maxwell® 用試薬カートリッジ

製品名	サイズ	カタログ番号
ccfDNA 精製		
Maxwell® RSC ccfDNA Plasma Kit	48 回分	AS1480
Maxwell RSC LV ccfDNA kit, Custom	48 回分	AX1115
ProNex® Size-Selective Purification System	10 ml	NG2001
miRNA 精製		
Maxwell® RSC miRNA Tissue Kit	48 回分	AS1460
Maxwell® RSC miRNA Plasma and Serum Kit	48 回分	AS1680
細菌叢からの核酸精製		
Maxwell® RSC PureFood GMO and Authentication Kit	48 回分	AS1600
EZ-Beads	50 本	AMR76813M



NGS 受託解析 (核酸バイオマーカー)

次世代シーケンサー (NGS) を使用した変異解析や発現解析などの各種受託解析を承っております。解析用途に合わせたライブラリー作製の工程のみの受託、あるいは作製されたライブラリーをお預かりしてシーケンスのみの受託にも対応しています。標準的なゲノム解析はもとより、miRNA-Seq、Human Bisulfite-Seq、ChIP-Seq など承ります。

より詳細については…



NGS受託
promega.co.jp/NGS/

DIA プロテオミクス受託解析 (タンパク質バイオマーカー)

定量性に優れた DIA プロテオミクス技術と最新鋭の質量分析計で測定することにより、最大 8000 種類のタンパク質を同定・比較定量 (サンプル種に依存) が可能になり、より詳細なマーカー探索を支援いたします。エクソソームタンパク質の解析などの実績もございます。

より詳細については…



プロテオーム受託
promega.co.jp/go?19014

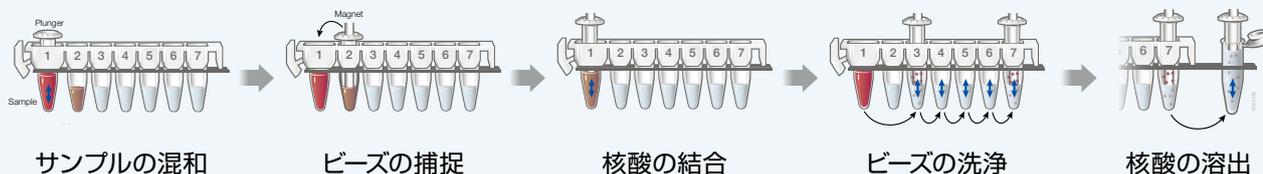
Maxwell® パーティクルムーバー

マグネットロッドにより磁性体ビーズを移動させる核酸精製方式を採用しており、しっかりと洗浄操作が行えるので不純物が多いあるいは粘性が高いといった精製の困難なサンプルでも柔軟に対応することができます。人の手技によらない再現性の高い安定した収量が得られるため、遺伝子検査など広く利用されています。

Maxwell® RSC 稼働ムービー



promega.co.jp/go?19015

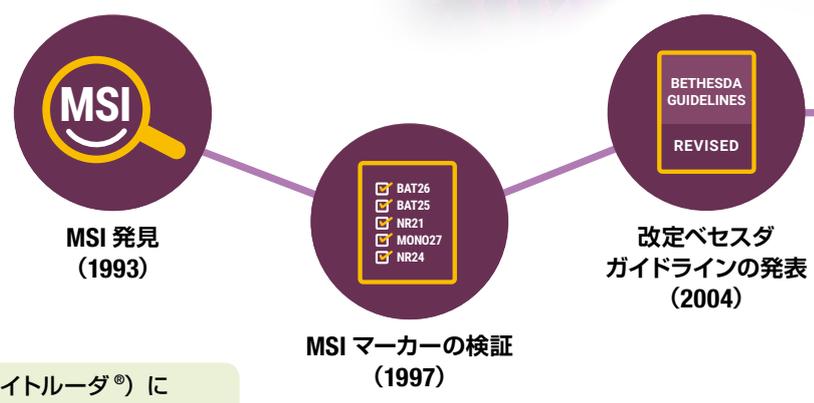
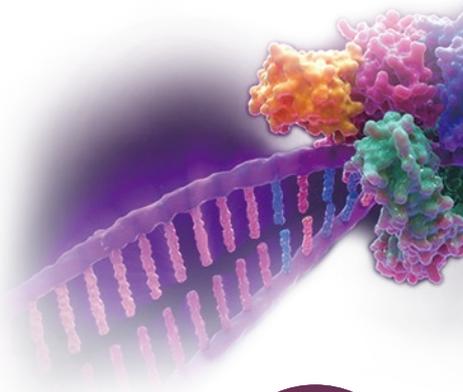


※ 1 サンプルを 1 カートリッジで処理



診断・検査

遺伝子検査・コンパニオン診断 ゲノム不安定性と核酸精製



マイクロサテライト不安定性検出 (MSI)

- ① 1993 年以降の遺伝性癌リスク (リンチ症候群) のバイオマーカー
- ② 免疫療法 (キイトルーダ®) に対するがんの反応バイオマーカー

歴史的に MSI はリンチ症候群、優性遺伝性癌傾向のスクリーニングに使用されてきました。最近、MSI の状態は免疫療法反応のバイオマーカーとして再発見され、MSI の状態は遺伝学および免疫腫瘍学においてますます重要なツールとなっています。

DNA ミスマッチ修復 (MMR) の欠陥は、遺伝性、生殖細胞系の突然変異またはメチル化によるサイレンシングによって引き起こされる可能性があります。いずれのメカニズムも機能的な MMR タンパク質の発現を抑制し、転写エラーがゲノム全体に蓄積することで引き起こされます。全体的なゲノム変異は正常な細胞機能を破壊し、制御不能な増殖および癌を誘導しますが、同時に変異を生じた新規タンパク質も産生します。これらの「外来」タンパク質は免疫原性を有する可能性があり、その組織に対して免疫エフェクター細胞が補充されるため MSI-H 状態は、免疫チェックポイント遮断阻害剤などの免疫療法に対する陽性反応の予測因子であると考えられています。

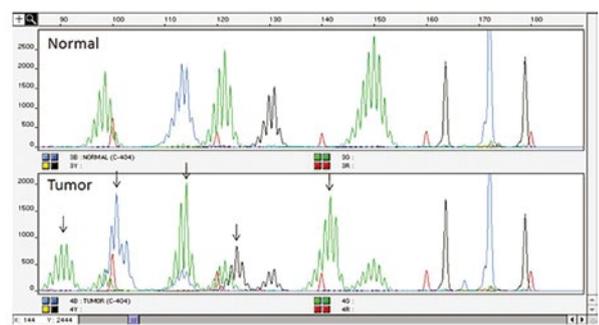
CTLA-4 および PD-1 経路に関する初期の研究以来、多くの免疫チェックポイントシグナル伝達経路が同定されており、新しい薬物標的の機会を創出しています。MSI 分析は、これらの治療戦略に対応する癌の特定に役立ち、最も効果的な治療法が適切な腫瘍に使用され、最良の結果が得られる可能性があります。

プロメガは、1 回のマルチプレックス PCR 反応で 5 つのモノヌクレオチドリピートマーカーを増幅し、MSI-high (MSI-H) を決定するための研究用試薬キット MSI Analysis System, Version 1.2 を販売しています。このシステムには MSI-high (MSI-H) 表現型分析用の 7 つのマーカーを同時に増幅する蛍光標識プライマー (マーカーパネル) が含まれています。その中には 5 つのモノヌクレオチドリピートマーカー (BAT-25、BAT-26、MONO-27、NR-21、NR-24) および 2 つの多型性の高いペンタヌクレオチドリピートマーカー (PentaC および PentaD) が含まれます。増幅された断片は、スペクトルキャリブレーションを行った後、ABI PRISM® 310、3100、3100-Avant、3130、3130xl、3100GeneticAnalyzer で検出することができます。

がん免疫に関する細胞ベースの研究ツールについては 2 ページへ

より詳細については…

MSI ステータスの重要性
promega.jp/msistatus1



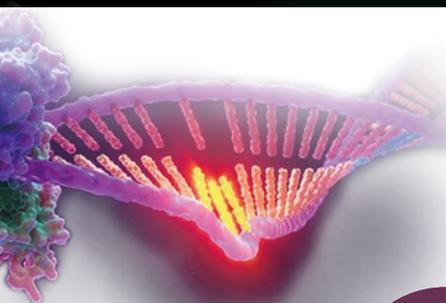
正常およびがんサンプルを用いた MSI 分析

より詳細については…

研究用 MSI 検査受託サービス
promega.co.jp/go?19016

製品名	サイズ	カタログ番号
MSI Analysis System, Version 1.2	1 セット	MD1641

上記製品は研究用の MSI キットです。
※ コンパニオン診断を目的としたキットあるいはサービスについては
ファルコバイオシステムズ URL (www.falco-dx.com/msi/) をご覧ください



研究用 MSI 検出試薬
販売開始
【プロメガ】
(2004)

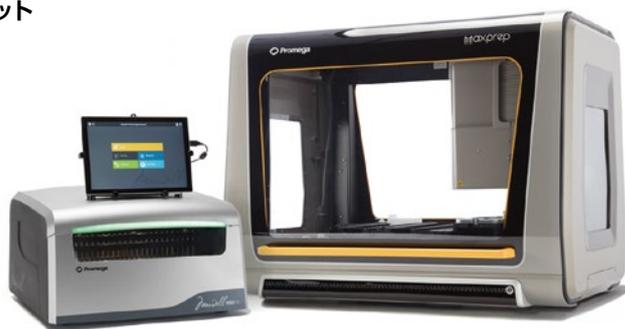
FDA
APPROVED

FDA が
dMMR/MSI-H 判定を承認
(2017)

感度が高く、遺伝子多型の影響を受けにくい1塩基繰り返し
の5マーカーを採用(プロメガパネル)

体外診断用 MSI 検査キット
販売開始
【ファルコバイオ】
(2018)

プロメガパネルを採用した
抗 PD-1 抗体キートラダ®
(ペムプロリズマブ) の
コンパニオン診断薬で世界で
初めての癌種横断的な診断薬



自動核酸精製装置 Maxwell® RSC 48 とリキッドハンドラー Maxprep™

PM FFPE、血液からの自動核酸精製

Maxwell® RSC Instrument は予め精製に必要な試薬が分注されたカートリッジを使用するため、簡便性と利便性を最大限に発揮した精製が可能になります。また、キシレンのような有害な有機溶剤は不要なため、より安全にご使用いただけます。精製された核酸は、PCR ベースの検出など様々なアプリケーションに使用することができます。



より詳細については…

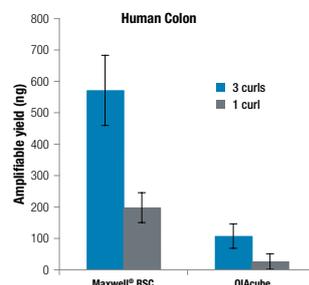


多検体からの核酸精製

promega.jp/maxwellht

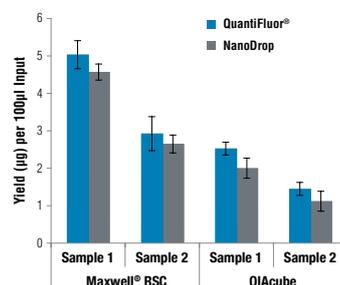
自動核酸精製装置

製品名	サイズ	カタログ番号
Maxwell® RSC (16 サンプル用)	1 台	AS4500
Maxwell® RSC 48 (48 サンプル用)	1 台	AS8500
Maxprep™ Liquid Handler	1 台	AS9100



FFPE 組織切片より各自動精製装置を用いて得られた DNA 収量の比較

収量は定量 PCR により決定し、ヒト結腸の FFPE のトリPLICATE サンプルの平均および標準偏差として示した。



全血より各自動精製装置を用いて得られた RNA 収量の比較

血液 1 ml あたりの RNA 収量を各ドナーおよび条件ごとに 4 回の反復サンプルの平均および標準偏差として示した。また、RNA は NanoDrop® および Quantus™ で定量した。

自動核酸精製キット

製品名	サイズ	カタログ番号
Maxwell® RSC DNA FFPE Kit	48 回分	AS1450
Maxwell® RSC RNA FFPE Kit	48 回分	AS1440
Maxwell® RSC Blood DNA Kit	48 回分	AS1400
Maxwell® RSC simplyRNA Blood Kit	48 回分	AS1380

体外診断向けの高品質で信頼性の高い部材、試薬の提供

体外診断薬の部材あるいは臨床診断ラボで使用する試薬は、高品質で一貫した製品が安定して供給されることが重要です。プロメガは厳格な品質管理プログラムの下で試薬を製造しており、ISO 9001 および ISO 13485 の認証の維持、ならびに cGMP 製造のための設備とシステムを通じて、最高品質基準で製品を製造しています。逆転写 / 増幅用の酵素あるいは核酸精製用の磁性体ビーズなど、臨床検査室や IVD メーカーのニーズを満たすためのソリューションとしてカスタマイズにも柔軟に対応します。さらに各種発光テクノロジーを利用した高感度 / ハイスループット向けイムノアッセイ用の技術・材料提供も行っています。



より詳細については…



カスタム製造

promega.jp/custom

その細胞株、大丈夫ですか？

細胞認証試験 ～ 実験室だけでなく医薬品製造現場にも忍び寄る恐怖！ ～

細胞株の誤認が問題になっています！

近年、ヒト培養細胞株でクロスコンタミネーションが多発していることが問題になっており、実験室で取り扱われている細胞株の認証は今後、研究成果の信頼性を高める上で必要不可欠な要素になることが予想され、実際にかん関連の学術誌の多くで投稿時に細胞認証を求めるケースが増えています。さらに、韓国では再生医療等製品に該当する医薬品で起こった細胞のクロスコンタミが大きな問題となっています (bit.ly/31hRRv9)。プロメガ株式会社は国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンクとヒト細胞株の認証試験受託についての業務提携を行い、オンラインで簡単にお申込みいただけるサービスを提供しています。本サービスでは、プロメガの STR (ショートタンDEMリピード) 解析システムと JCRB 細胞バンクで構築された STR データベースによってヒト培養細胞に関するクロスコンタミネーションの可能性の有無についてご報告いたします。

特長：

- **世界の STR データベースと照合**
世界中の細胞バンク (JCRB、ATCC、DSMZ、RCB*) の登録データ約 5000 との照合結果をご提供
- **信頼の細胞認証**
世界有数の細胞バンク JCRB 細胞バンクによる信頼性の高い分析報告書 (細胞認証書)
- **PowerPlex® 16 STR システムを採用**
個人識別にも用いられる高品質で高い識別能力を有す PowerPlex® 16 STR System を採用
- **簡単 & 短時間**
Web で注文でき、面倒なサンプル調製不要 (FTA カード使用) で約 2 週間で結果が得られます。

まんがで解説! (PDF)



細胞認証試験とは？

promega.co.jp/go?19007

オンライン注文については…



ヒト細胞認証試験

promega.co.jp/hca/

細胞バンクに登録されている実験用の細胞株だけでなく再生医療、細胞治療などで使用する患者由来細胞の確認試験などについてもお問合せください。

下記のような条件を満たせば受付可能です！

- ・ 倫理委員会の承認サンプル
- ・ サンプル名を匿名化 (患者様のお名前が依頼は厳禁)
- ・ 患者由来の親細胞と実験対象細胞の 2 検体分が依頼のこと
- ・ 不活化細胞であること (弊社輸送形態が FTA カードを使用する為問題無し)

日本語 Web site : www.promega.jp

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

プロメガ株式会社

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

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

※製品の仕様、価格については2019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