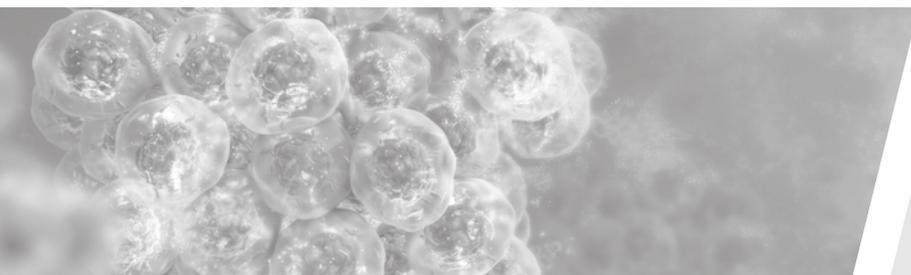
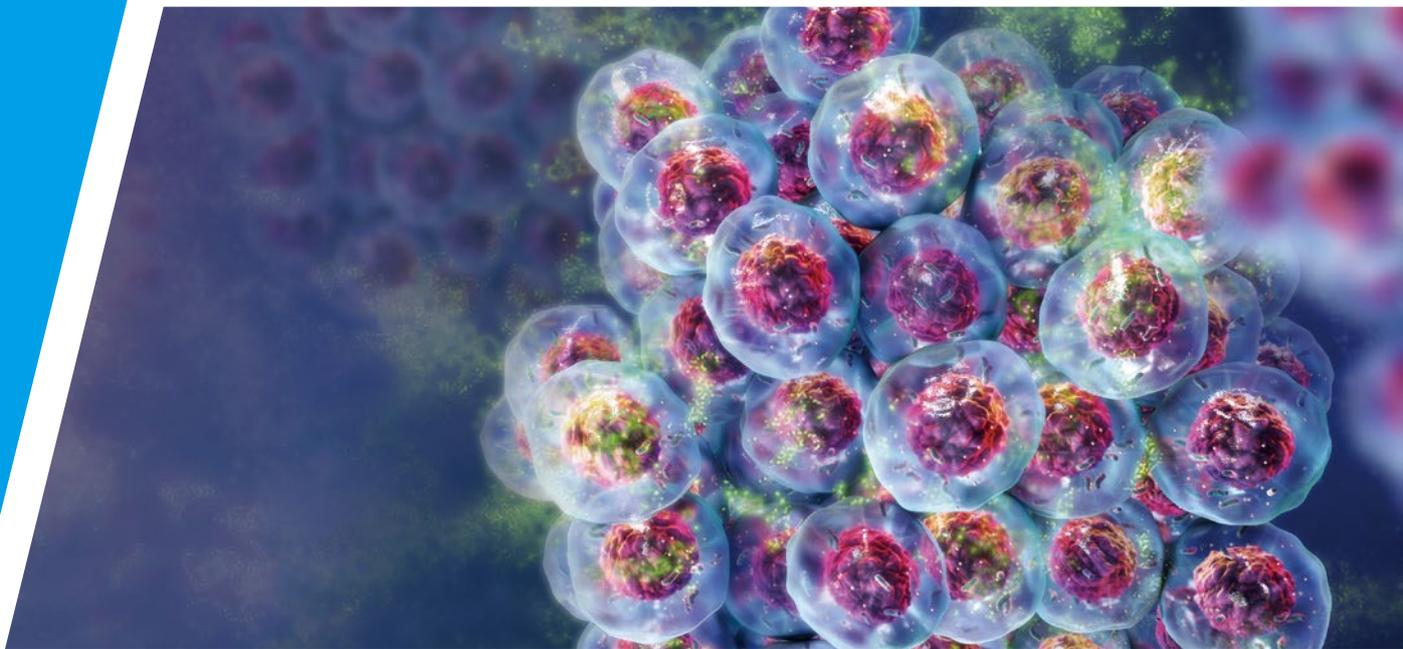


# Cell Based Assay Guide

## 高次元の細胞実験ガイド



**NEW**

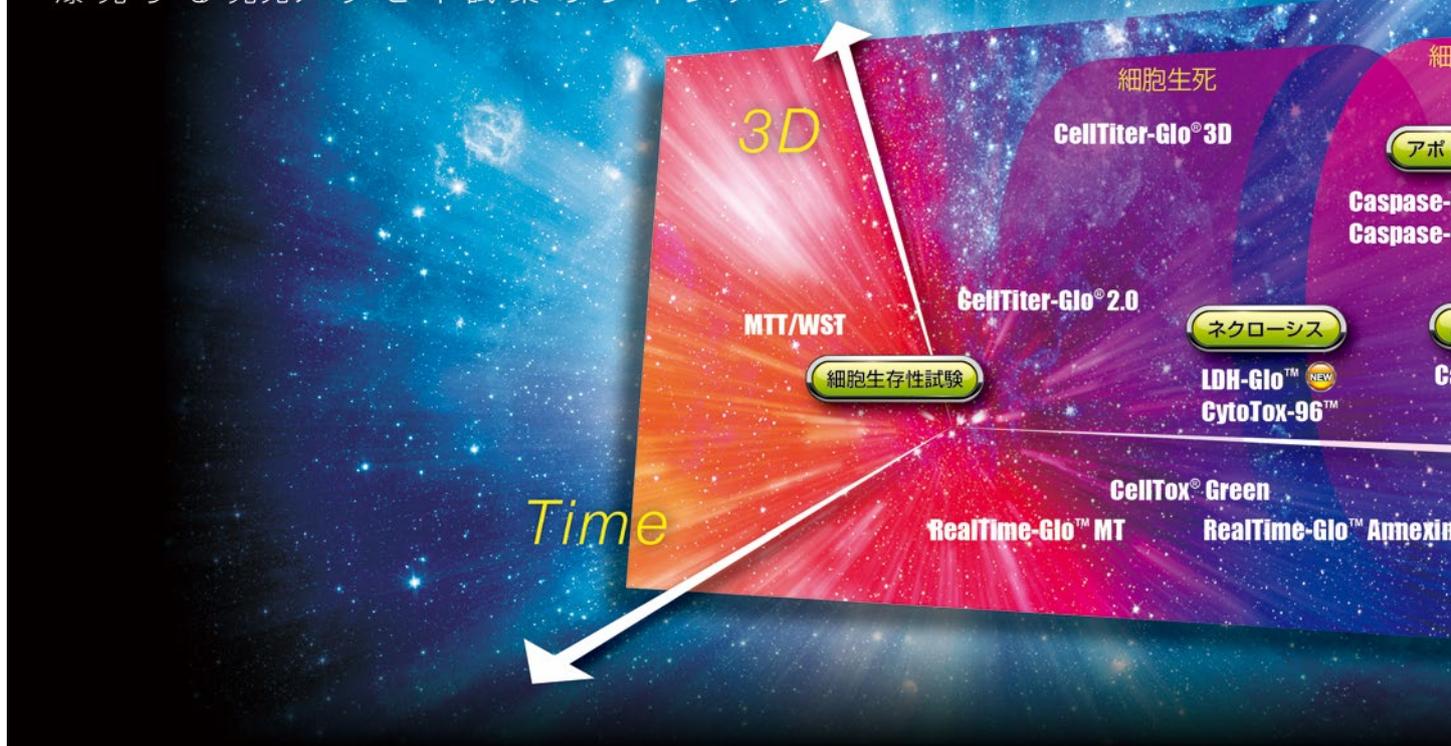
- ・LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay
- ・Glycerol-Glo™ Assay
- ・Triglyceride-Glo™ Assay
- ・Cholesterol/Cholesterol Ester-Glo™ Assay
- ・Caspase-Glo® 3/7 3D Assay

### Contents

・イントロダクション	2	・オートファジー、プロテアソームアッセイ	23
・細胞ベースアッセイ選択ガイド <b>NEW</b>	4	・シグナル伝達アッセイ (cAMP)	25
・細胞生存性 & 細胞毒性試験	6	・その他 (HDAC、P450)	27
・アポトーシス・パイロトーシスアッセイ	15	・発光 & レポーターテクノロジーについて (概要)	29
・酸化ストレスアッセイ	18	・マルチプレートリーダー	32
・エネルギー代謝アッセイ (糖代謝・脂質代謝 <b>NEW</b> )	20		

# プロメガの細胞アッセイ **ビッグバン**

爆発する発光アッセイ試薬のラインナップ



## 細胞を用いたバイオアッセイ

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、細胞を用いたアッセイ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て処理能力や操作性にも優れます。また、近年ではより生体の反応に近い細胞として初代培養細胞や患者由来の疾患 iPS 細胞、3次元細胞 / マイクロティッシュが用いられるようになり、より繊細で高感度なアッセイ系が望まれています。プロメガでは、これらバイオアッセイに最適なルシフェラーゼによる生物発光を中心とした高感度で簡便なアッセイ試薬を開発すると同時に、より生物学的に有意な情報が得られる様々なシステム構築を目指しています。

- 1 細胞内在マーカーの測定**：細胞に内在する酵素や代謝物などのバイオマーカーを測定することで細胞の生死から細胞死のメカニズム、さらには細胞状態を調べることができます。LDH や DCP は死細胞（細胞毒性試験：9, 11 ページ参照）、ATP や LCP は生存細胞（細胞生存試験：6, 11, 13 ページ参照）を、カスパーゼはアポトーシス・パイロトーシスなど細胞死のメカニズム（15 ページ参照）を、GSH・H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> などは酸化ストレスの指標（18 ページ参照）として測定することができます。トリグリセリド、コレステロール、グルコース、グルタミン、乳酸などのエネルギー代謝関連マーカーはがんや糖尿病などの研究で注目されており、プロメガの発光アッセイ試薬として発売されました（20 ページ参照）。
- 2 バイオセンサー導入による細胞内情報の測定**：測定・検出が容易な外来性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ことができます。レポーター遺伝子の upstream に様々な細胞内シグナルに対応する応答配列を付加したり、標的タンパク質をコードする遺伝子にレポーター遺伝子を融合させることでより詳細な細胞内現象を捕えることができます（オートファジー 23 ページ、cAMP 25 ページ参照）。



# 細胞ベースアッセイ選択ガイド

製品名	メーカー	検出シグナル	検出までの時間	感度	マルチ	3D	リアルタイム	ページ
<b>細胞生存性</b>								
RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay	還元能	発光	0分 (最長72時間までのリアルタイムアッセイ) 10分間(エンドポイント)	細胞30個	◎	◎	◎	8
CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay	ATP (エネルギー合成能)	発光	30分間	3次元培養細胞 (<700µm)	◎	◎	-	7
CellTiter-Glo® Assay 2.0	ATP (エネルギー合成能)	発光	10分間	細胞10個*	◎	○	-	6
CellTiter-Fluor™ Assay	LCP	蛍光(400Ex/505Em)	0.5~3時間	細胞40個	◎	○	-	11
CellTiter-Blue® Assay	還元能	蛍光(560Ex/590Em) または発色(570nm)	1~4時間	細胞50個*	○	-	-	13
CellTiter-96® Aqueous One Solution Assay	還元能	発色(490nm)	1~4時間	細胞800個	-	-	-	13
<b>細胞毒性</b>								
<b>NEW</b> LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay	LDH	発光	約1時間	細胞10個	◎	◎	△	12
CellTox™ Green Cytotoxicity Assay	DNA	蛍光(513Ex/532Em)	15分~72時間	細胞200個	◎	◎	◎	9
CytoTox-Glo™ Assay	DCP	発光	15分間	細胞10個	○	-	-	11
CytoTox-Fluor™ Assay	DCP	蛍光(485Ex/520Em)	0.5~3時間	細胞10個	○	○	-	11
CytoTox-ONE™ Assay	LDH	蛍光(560Ex/590Em)	10分間	細胞200個	○	-	-	13
CytoTox 96® Cytotoxicity Assay	LDH	発色(490nm)	30分間	細胞1000個	-	-	-	13
MultiTox-Fluor Assay	LCP および DCP	蛍光(400Ex/505Em) (485Ex/520Em)	0.5~3時間	生細胞40個/ 死細胞10個	○	-	-	11
MultiTox-Glo Assay	LCP および DCP	蛍光(400Ex/505Em) / 発光	30分間	生細胞40個/ 死細胞10個	○	-	-	11
ApoLive-Glo™ Multiplex Assay	LCP および Caspase-3/7	蛍光(400Ex/505Em) / 発光	30分間	生細胞40個 / アポトーシス細胞20個	○	-	-	17
ApoTox-Glo™ Triplex Assay	LCP、DCP および Caspase-3/7	蛍光(400Ex/505Em) (485Ex/520Em) / 発 光	1時間	生細胞40個 / 死細胞10個 / アポトーシス細胞20個	○	-	-	17
Mitochondrial ToxGlo™ Assay	DCP および ATP	蛍光(485Ex/520Em) / 発光	30分間	-	○	-	-	14
<b>アポトーシス/パイロトーシス</b>								
RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis Assay	ホスファジチルセリンの 転移	発光	0分 (48時間程度までの リアルタイムアッセイ)	-	◎	◎	◎	15
Caspase-Glo® Assay	Caspase-3/7, 8, 9	発光	30分間~2時間	細胞20個(3/7)* 細胞1000個(8) 細胞1500個(9)	◎	◎ (注)	-	16
Apo-ONE® Caspase-3/7 Assay	Caspase-3/7	蛍光(499Ex/521Em)	1~18時間	細胞200個*	◎	◎	-	16
Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay	Caspase-1 (インフラマソーム活性)	発光	1時間	細胞10個	◎	-	-	17
<b>酸化ストレス</b>								
GSH/GSSG-Glo™ Assay	総グルタチオン /GSSG	発光	1時間	細胞300個*	◎	-	-	18
GSH-Glo™ Assay	GSH	発光	1時間	細胞300個*	◎	◎	-	18
ROS-Glo™ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Assay	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (活性酸素)	発光	2時間	<細胞100個	◎	-	-	19

注: 3D 培養細胞用マニュアルが用意された Caspase-Glo® 3/7 3D Assay が新発売

製品名	マーカー	検出シグナル	検出までの時間	感度	マルチ	3D	リアルタイム	ページ
<b>エネルギー代謝</b>								
NAD/NADH-Glo™ Assay	NAD/NADH	発光	1 時間	細胞 (10nM ~ 400nM: NAD <sup>+</sup> または NADH)	◎	◎	—	20
NADP/NADPH-Glo™-Glo™ Assay	NADP/NADPH	発光	1 時間	細胞 (10nM ~ 400nM: NADP <sup>+</sup> または NADPH)	◎	◎	—	20
Glucose Uptake-Glo™ Assay	グルコース取込み (2-デオキシグルコース-6-リン酸 [2DG6P])	発光	約 1 時間	—	◎	◎	—	21
Glucose-Glo™ Assay	グルコース	発光	約 1 時間	—	◎	◎	◎	21
Lactate-Glo™ Assay	乳酸	発光	約 1 時間	—	◎	◎	◎	21
Glutamate-Glo™ Assay	グルタミン酸	発光	約 1 時間	—	◎	◎	◎	21
Glutamine/Glutamate-Glo™ Assay	グルタミン / グルタミン酸	発光	約 1 時間	—	◎	◎	◎	21
<b>NEW</b> Triglyceride-Glo™ Assay	トリグリセリド	発光	1-2 時間	1-80μM グリセロール	◎	◎	△	22
<b>NEW</b> Glycerol-Glo™ Assay	グリセロール	発光	1-2 時間	1-80μM グリセロール	◎	◎	△	22
<b>NEW</b> Cholesterol Cholesterol Ester-Glo™ Assay	コレステロール	発光	1-2 時間	1-80μM コレステロール	◎	◎	△	22
<b>タンパク質分解</b>								
Autophagy LC3 HiBiT Reporter Assay	導入遺伝子から発現する LC3 融合タンパク質センサー	発光	—	—	◎	◎	—	23
Proteasome-Glo™ Cell-Based Assays	Proteasome (chymotrypsin-like, trypsin-like, caspase-like activities)	発光	10 ~ 15 分間	500 個 (付着細胞)	—	—	—	24
<b>シグナル伝達</b>								
cAMP-Glo™ Assay	cAMP	発光	—	—	○	—	—	25
GloSensor™ cAMP Assay	導入遺伝子から発現する バイオセンサー	発光	—	—	○	—	◎	26
<b>エピジェネティクス</b>								
HDAC-Glo™ Assay	HDAC (class I & II)	発光	15 ~ 45 分間	蛍光法の 10 ~ 100 倍	○	—	—	27
HDAC-Glo™ Class IIa Assay	HDAC (class IIa)	発光	20 分間	蛍光法の 100 倍	○	—	—	27
HDAC-Glo™ 2 Assay	HDAC (isozyme 2)	発光	20 分間	蛍光法の 100 倍	○	—	—	27
<b>薬剤代謝</b>								
P450-Glo™ Assays	CYP1A2, 3A4, 1A1, 2C9, 4A	発光	1 ~ 6 時間	高	○	◎	—	28

**マルチ** : 他のアッセイと組み合わせたマルチアッセイの適応性。 **3D** : 3次元細胞を用いたアッセイへの適応性。 **リアルタイム** : 継続的なリアルタイム測定への適応性。

LCP: Live cell Protease, DCP: Dead Live Cell  
 \* 384 ウェル LCP: Live cell Protease, DCP: Dead Live Cell  
 \* 384 ウェル

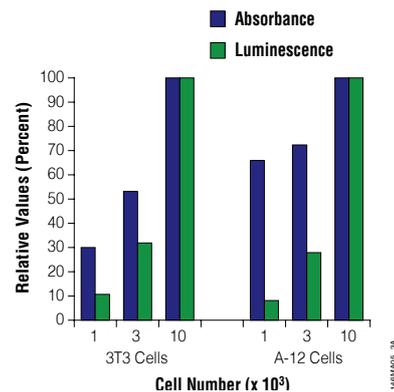
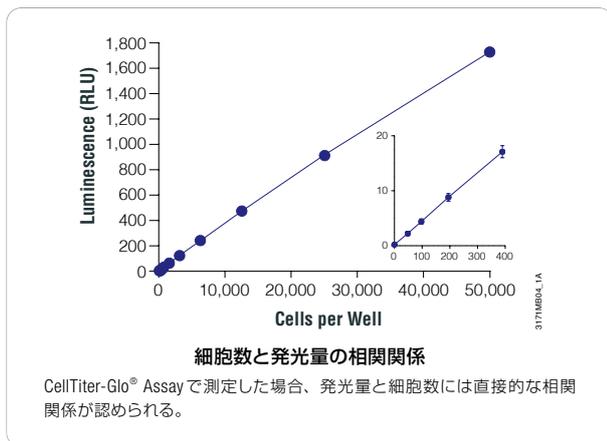
# 細胞生存性エンドポイントアッセイのゴールドスタンダード

## CellTiter-Glo® Assay (発光：細胞生存性) マルチ

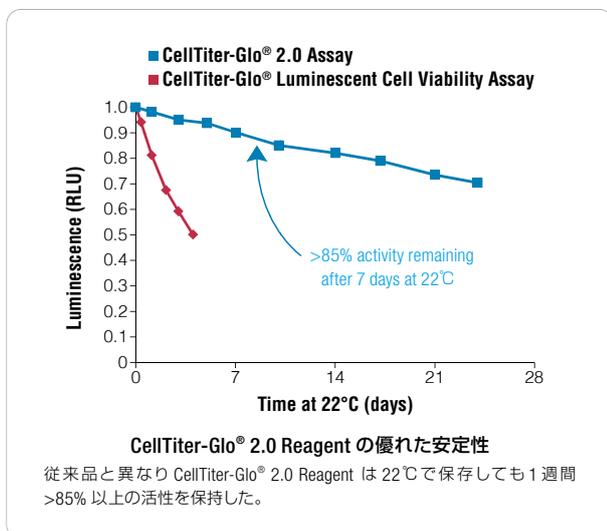
超高感度な細胞内 ATP 測定をベースとした細胞生存試験!“高安定性タイプ”と“3D細胞適応タイプ”が登場!

細胞生存性を測定する上でより安定性が高く、高精度なマーカーの選択が重要となります。ATP (アデノシン三リン酸) は代謝活性のある全ての細胞に存在し、その濃度は細胞がネクロシスあるいはアポトーシスを起こしたときに急速に減少するため、細胞障害、細胞増殖抑制あるいは細胞増殖効果の優れたマーカーとして広く用いられています。プロメガの CellTiter-Glo® シリーズの細胞生存試験は、代謝活性のある細胞に由来する ATP を定量することで培養中の生存細胞数を測定する細胞増殖・毒性システムです。マルチプレートのアッセイ用にデザインされており、1種類の試薬を加えるだけなので自動化されたハイスループットスクリーニング (HTS) にも最適です。優れた感度を示すため、発色法では困難な浮遊細胞・三次元培養細胞を用いる場合に威力を発揮します。CellTiter-Glo® シリーズに保存安定性が向上してより使いやすくなった CellTiter-Glo® 2.0 と三次元培養細胞用に溶解力が向上した CellTiter-Glo® 3D (次ページ参照) が加わりました。

- **ホモジニアス**：ワン-ショットタイプ (添加→混合→測定) なので他の ATP 測定システムに比べプレートのハンドリングが最小限。
- **迅速**：試薬添加 10 分後にデータが得られます。
- **高感度**：標準的な発色または蛍光定量法に比べ優れた感度 (細胞 10 個 [384 プレート]、細胞 50 個 [96 プレート] を検出)。
- **正確**：発色法より正確な定量性
- **長時間発光**：発光が非常に安定 (CellTiter-Glo® シリーズの比較表 次ページ参照)。
- **試薬安定性**：溶液として供給される CellTiter-Glo® 2.0 は冷蔵庫 (4°C) で 2 ヶ月、室温 (22°C) でも 1 週間安定 (> 85% 活性保持)
- **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



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 (100µl)。CellTiter-Glo® Reagent (100µl) または WST-1 (10 µl) を添加、混和し、インキュベーション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。



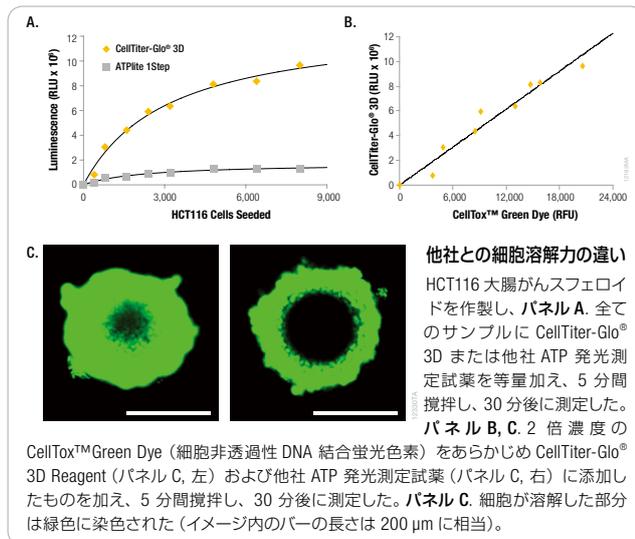
製品名	サイズ	カタログ番号
<b>細胞生存性試験 (発光・ATP)</b>		
	10ml	G7570
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	10 × 10ml	G7571
	100ml	G7572
	10 × 100ml	G7573
CellTiter-Glo® 2.0 Assay	10ml	G9241
	100ml	G9242
	500ml	G9243

※ 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。

# CellTiter-Glo®-3D Cell Viability Assay (発光: 細胞生存性) マルチ 3D

## 細胞溶解力を強化した 3次元培養細胞用 細胞生存試験

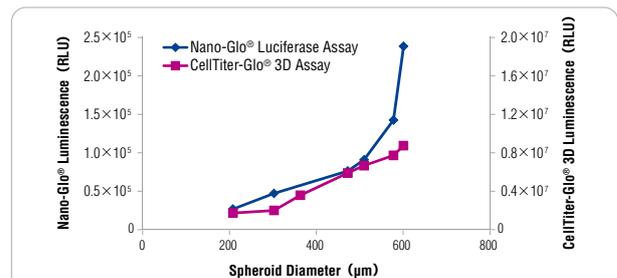
通常の細胞増殖試験試薬は単層培養細胞用で細胞塊の中心まで試薬が届かないため、3次元培養細胞の測定は困難です。CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay は 3次元培養細胞の生細胞数を ATP 量 (代謝活性を有する細胞のマーカー) の測定に基づき測定するホモジニアスなアッセイシステムです。3次元培養細胞で作製した微小組織用にデザインされており、細胞溶解能力が強化されています。溶液タイプとして供給されるため、従来品のように調製時に凍結乾燥した基質をバッファーで溶解する必要もありません。CellTiter-Glo® 3D Assay はハンギングドロッププレート、超低接着表面プレート、Matrigel™ コーティングプレート、アガロースコーティングプレート、メチルセルロース懸濁培養、Alvetex® プレートで得られた 3次元細胞での実績を有しています。標準的な ATP アッセイで使用されるネイティブのホタルルシフェラーゼよりも安定性が高く、界面活性剤や pH などの影響を受けにくいプロメガの Ultra-Glo™ ルシフェラーゼを使用することにより溶解力を高めた 3次元培養細胞対応の CellTiter-Glo® 3D が完成しました。



スフェロイドの直径 (μm)	ATP 回収 (pmol/microtissue)		比率
	CellTiter-Glo® (従来品)	CellTiter-Glo® 3D	
188	16 ± 4	17 ± 4	1.10
386	79 ± 3	94 ± 11	1.19
459	103 ± 2	126 ± 11	1.22
565	127 ± 3	178 ± 17	1.40

### 従来品とのスフェロイドからの ATP 検出比較

HCT116 細胞を InSphero GravityPLUS™ 96-well hanging-drop platform に播種し、表示サイズのマイクロティッシュを形成するまで 4 日間培養し、CellTiter-Glo® または CellTiter-Glo® 3D を用いて測定した。検出した ATP 量は ATP スタンダードより算出した。



### マイクロティッシュにおける HIF-1 プロモーター活性の測定

HIF-1 プロモーターにより駆動する NanoLuc® ルシフェラーゼ遺伝子を含む HCT116 細胞を 4 日間 InSphero GravityPLUS™ 3D 細胞培養システムで培養したマイクロティッシュ (約 200-700 μm) を調製し、NanoGlo® または CellTiter-Glo® 3D でレポーター活性および細胞生存性を測定した。マイクロティッシュの直径が大きくなるほど酸化ストレスが増加した。

製品名	サイズ	カタログ番号
細胞生存性試験 (発光・ATP)	10ml	G9681
CellTiter-Glo® 3D Cell Assay	10 × 10ml	G9682
	100ml	G9683

※ 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。

	CellTiter-Glo® 2.0	CellTiter-Glo® 3D	CellTiter-Glo® (従来品)
保存性	◎ 4℃、2 カ月 (> 85%) 室温、7 日 (> 85%)	○ 4℃、3.5 日 (> 90%) 室温、12 時間 (> 90%)	○ 4℃、3.5 日 (> 90%) 室温、12 時間 (> 90%)
操作性	◎ CellTiter-Glo® 2.0 Reagent 室温または 4℃ 保存 (4℃ 保存の場合は室温に平衡化)	◎ CellTiter-Glo® 3D Reagent -20℃ 保存 融解後、室温に平衡化	△ バッファー 基質 -20℃ 保存 融解後、室温に平衡化 混和 (室温) CellTiter-Glo® Reagent 4℃ / -20℃ 保存
アプリケーション	単層培養細胞	3次元培養細胞 (< 700 μm)	単層培養細胞
溶解力	○	◎	○
発光半減期	> 3 hr	> 3 hr	> 5 hr
発光レベル	★★★	★★★	★★
所要時間*	10 分以内	30 分以内 (攪拌 5 分 + 静置 25 分)	10 分以内
製品形態	1 液	1 液	基質 + バッファー

\* 試薬添加から測定開始までの時間

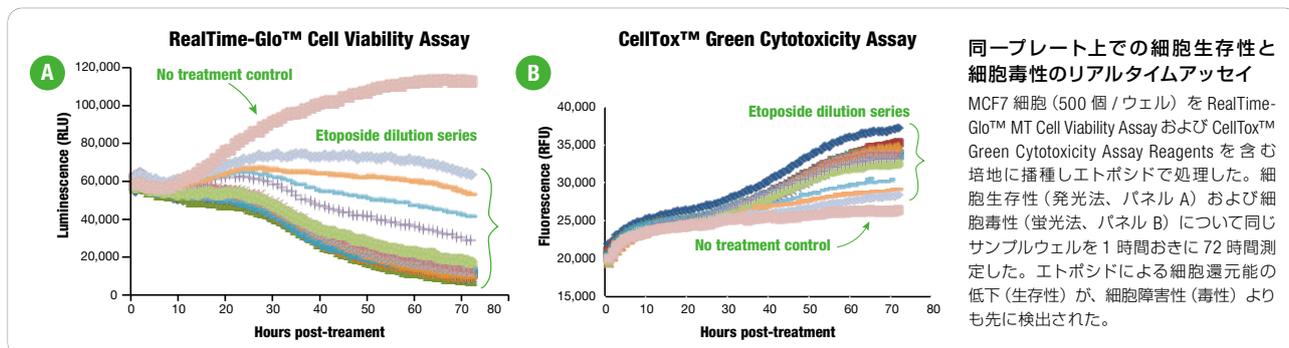
# リアルタイムの細胞生存性 & 毒性試験

## RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay (発光: 細胞生存性) マルチ 3D リアルタイム

### 従来法 (MTT/WST) と同じ細胞の還元能を指標にした高感度リアルタイムアッセイ

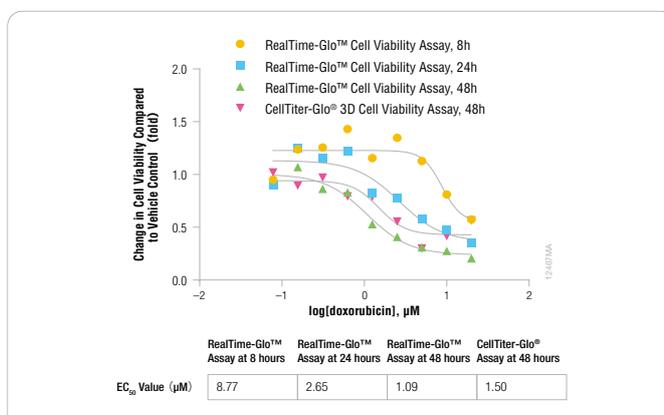
RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay は細胞の還元力 (代謝 [MT]) を測定することにより培養中の生細胞数をリアルタイムに測定するための細胞非溶解性の発光ホモジニアスアッセイ法です。アッセイでは培養細胞に NanoLuc® ルシフェラーゼと細胞内に透過する NanoLuc® 基質前駆体を添加します。生存細胞はこの特殊な前駆体基質を還元し、NanoLuc® ルシフェラーゼの基質を生成します。この基質は細胞内から培地に拡散し、NanoLuc® ルシフェラーゼにより迅速に消費され発光シグナルを生じます。このシグナルは生存細胞数に相関するため、細胞毒性研究に理想的です。試薬は最大 72 時間は安定で細胞への毒性もありません。細胞の洗浄、培地の除去、その他の試薬を添加する必要もありません。このアッセイは細胞溶解が不要で、同じウェルを長時間にわたってモニタリングすることができます。これにより、必要な細胞数を抑え、細胞培養、下流のアプリケーション (マルチプレックスアッセイや核酸の分析) にかかるコストを低減することができます。また 3 次元培養細胞でのアッセイにも利用できます。

- **リアルタイムな細胞生存試験**: 毒性の開始点の決定、長時間におよぶ効力 [potency] (有効性 [efficacy] に対して) の分析、異なる細胞増殖の分析を行うための簡便なプレートベースでの細胞生存性リアルタイムモニタリング。
- **優れた感度**: 他の蛍光法 / 発色法に比べ、優れたシグナル / バックグラウンド比および高い感度が短時間で得られます。
- **柔軟なアッセイ**: 細胞播種時またはテスト化合物添加時、あるいは測定したい時点で試薬を加えるだけ。エンドポイントアッセイも可能。
- **細胞非溶解性**: 細胞溶解を伴わないため、特殊なフィルターを用いずに細胞を他の発光 / 蛍光アッセイとのマルチアッセイに使用したり、その他の様々なアプリケーションに細胞を用いることが可能。これは少ないサンプルより多くのデータポイントでより多くの情報が得られることを意味します。
- **確立された細胞生存性マーカーを測定**: 細胞の還元力を指標にしたアッセイは細胞生存性の代謝マーカーとして長年の信頼を得ています。
- **自動化に対応**: アッセイは自動化、ハイスループットに対応しており、反応はスケール変更自在で、96、384、1536 ウェルプレートの低容量にも対応。



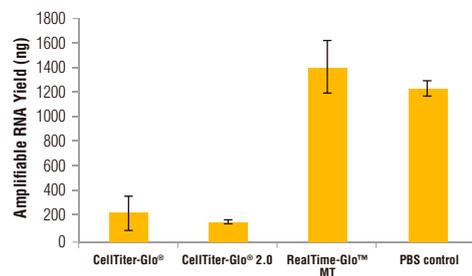
### 同一プレート上での細胞生存性と細胞毒性のリアルタイムアッセイ

MCF7 細胞 (500 個 / ウェル) を RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay および CellTox™ Green Cytotoxicity Assay Reagents を含む培地に播種しエトポシドで処理した。細胞生存性 (発光法、パネル A) および細胞毒性 (蛍光法、パネル B) について同じサンプルウェルを 1 時間おきに 72 時間測定した。エトポシドによる細胞還元能の低下 (生存性) が、細胞障害性 (毒性) よりも先に検出された。



### スフェロイドを用いた RealTime-Glo™ と CellTiter-Glo™ 3D による細胞生存試験

結腸がんスフェロイド (直径 522 ± 4 μm) は 4,000 個の細胞を播いた 96 ウェルの GravityPLUS™ ハンギングドロッププレート (InSphero AG) で 4 日かけて調製した。表示濃度のドキシルピシンで処理した後、RealTime-Glo™ Reagent をサンプルセットに添加して 48 時間までの異なるタイムポイントで細胞生存性をモニタリングした。異なるサンプルセットでは 48 時間後に CellTiter-Glo™ 3D Reagent を添加した。グラフではドキシルピシン処理細胞とピークルコントロールの細胞生存性の倍率変化を示し、GraphPad Prism® ソフトウェア (ver 5.03.) を用いて EC<sub>50</sub> 値 (μM) を決定した。



### 細胞生存試験後の自動精製 RNA の収量

細胞の生存性を RealTime-Glo®, CellTiter-Glo® (2.0) で測定した後、Maxwell® RSC を用いて Total RNA を精製した。細胞非破壊アッセイである RealTime-Glo® は細胞破壊して測定する CellTiter-Glo® に比べ多くの RNA が得られた。

製品名	サイズ	カタログ番号
<b>細胞生存性試験 (発光・還元能)</b>		
RealTime-Glo™	100 回分	G9711
MT Cell Viability Assay	10 × 100 回分	G9712
	1000 回分	G9713

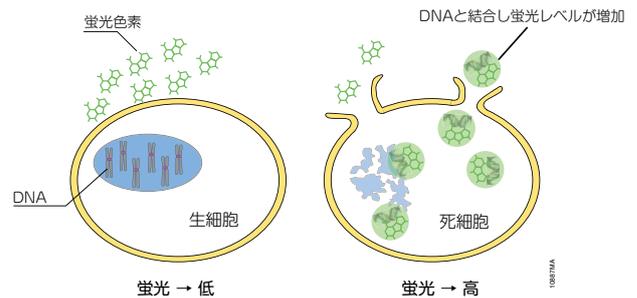
\*表示のサイズは 96 ウェルプレートの場合。

## CellTox™ Green Cytotoxicity Assay (蛍光:細胞毒性) マルチ 3D リアルタイム

### 最も簡便な細胞毒性試験。長時間の経時変化も追跡可能!

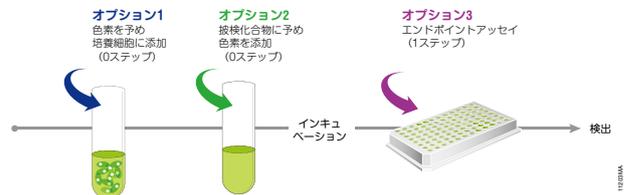
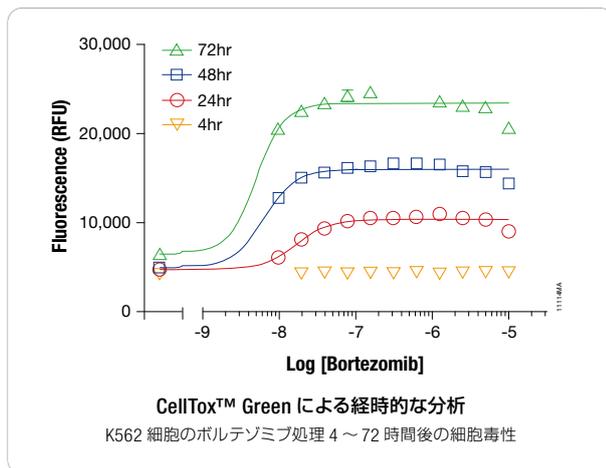
細胞毒性を検出する際、細胞死のマーカーの選択が重要となります。従来の細胞毒性試験においては、LDH や死細胞由来のプロテアーゼなどの酵素活性をマーカーとしてきました。これら酵素ベースの細胞毒性キットの問題点として、細胞死マーカーとしての酵素が長時間にわたる培養により分解してしまうという点がありました。プロメガではこの問題点を克服するため、細胞膜非透過性の新規な DNA 結合型蛍光色素を利用したアッセイキット CellTox™ Green Cytotoxicity Assay を開発しました。CellTox™ Green Cytotoxicity Assay は細胞膜非透過性の DNA 結合型蛍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

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



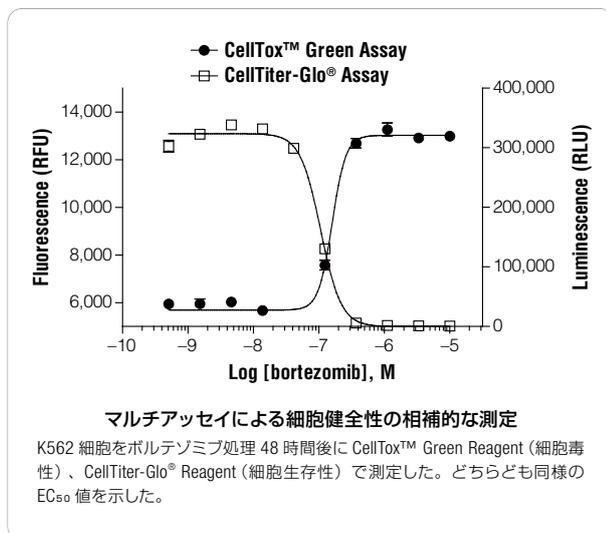
#### CellTox™ Green の測定原理

細胞非透過性の蛍光色素が死細胞から漏出した DNA に結合し蛍光強度が増加



#### 3つのプロトコルから選べます!

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



製品名	サイズ	カタログ番号
<b>細胞毒性試験 (蛍光・DNA)</b>		
CellTox™ Green Cytotoxicity Assay	10ml	G8741
	50ml	G8742
	100ml	G8743
CellTox™ Green Express Cytotoxicity Assay (Dye)	200µl	G8731

※ 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。

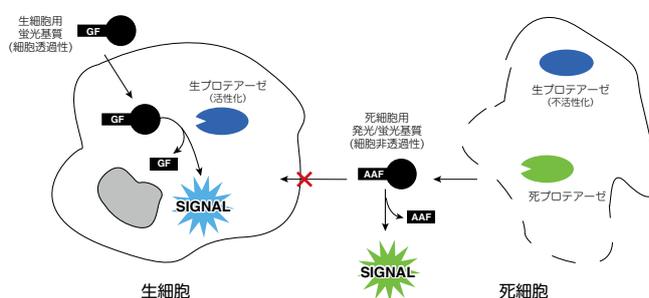
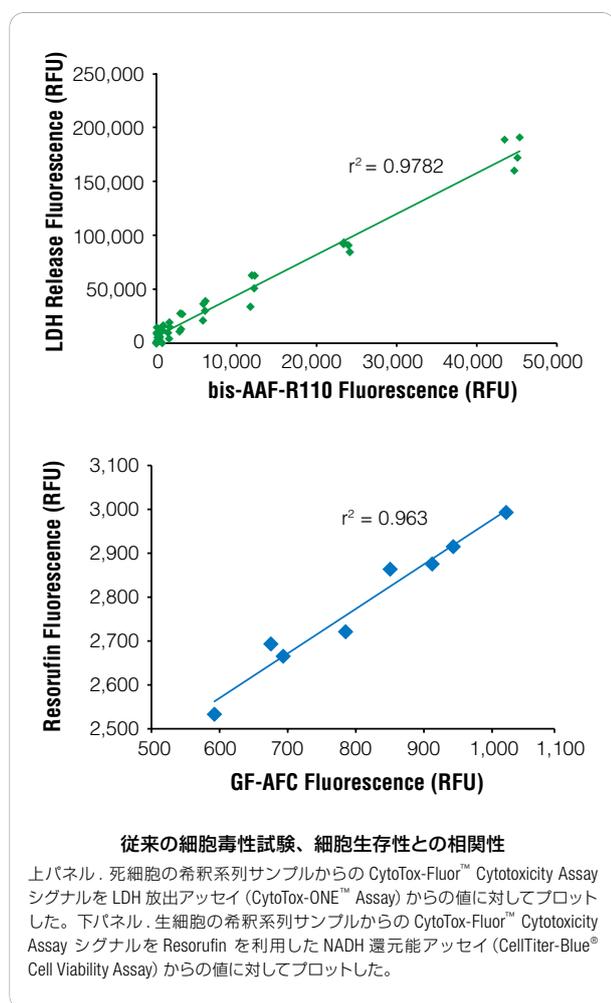
# 新 規なプロテアーゼマーカーを採用した細胞生存 & 細胞毒性試験

## 新規プロテアーゼマーカー測定試薬は細胞にやさしくマルチアッセイにも最適

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

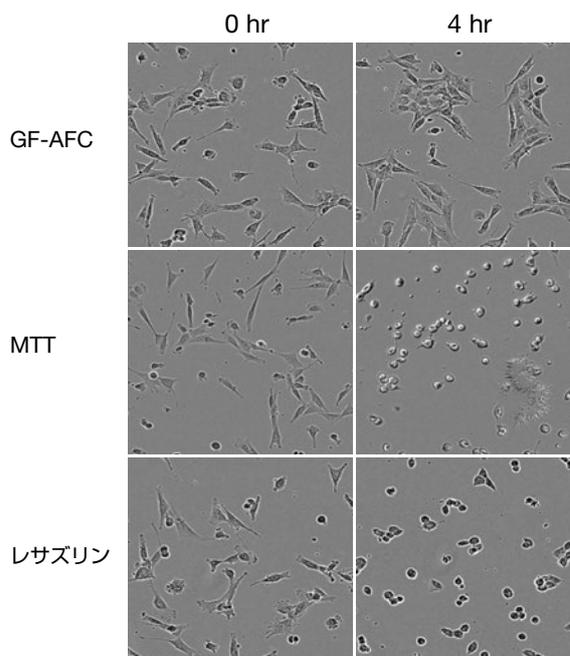
生細胞プロテアーゼ (LCP: Live Cell Protease) は細胞透過性のペプチド基質 (蛍光:GF-AFC) を用いて測定します。この生細胞プロテアーゼマーカーは、細胞膜の完全性が失われて周囲の培地に漏出すると不活性化され、生細胞で起こるような反応は見られなくなります。一方、死細胞プロテアーゼ (DCP: Dead Cell Protease) マーカーは細胞膜の完全性が失われた細胞から漏出して初めて測定されます。この活性は細胞非透過性のペプチド基質 (蛍光:AAF-R110 または発光:AAF-Glo™) で測定します。

これらの基質を採用した新しい細胞増殖試験、細胞毒性試験キットを開発し、細胞死のメカニズムを解析するためにこれらのシステムを組み合わせたマルチアッセイシステムを揃えました。また、プロメガの発光アッセイや波長の区別が可能な他の蛍光アッセイと併用することもできます (カスパーゼアッセイ、レポーターアッセイ、他のバイオマーカーを用いた生存性試験など)。



### 新しい細胞生存性・毒性試験の測定原理

GF-基質は生細胞に透過し、“生細胞”プロテアーゼ (LCP) による切断でシグナルを生じる。AAF-基質は生細胞に透過できず、漏出した“細胞死”由来のプロテアーゼ (DCP) によりシグナルを生じる。



### GF-AFC および MTT、レサズリンの毒性比較

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

## シングルアッセイ

## CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay

(蛍光:細胞生存性)

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

## CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay

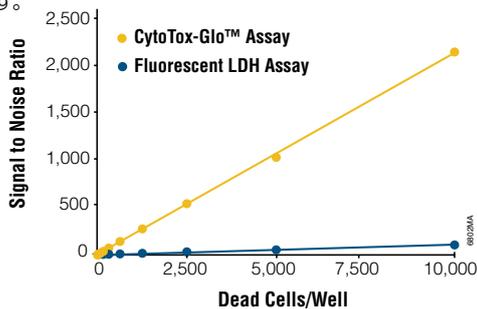
(蛍光:細胞毒性)

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

## CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay

(発光:細胞毒性)

発光基質 (AAF-Glo™) を用いて細胞毒性を測定します。非常に高感度で従来の LDH アッセイと優れた相関性を示します。本製品に添付される細胞溶解剤を加えることにより、各アッセイウェル内の総細胞数に応じた発光シグナルを得ることもできます。そのため、この総細胞数の発光値から死細胞の発光シグナルを差し引くことにより生存性を算出することもできます。



LDH 蛍光アッセイ法に比べ優れた CytoTox-Glo™ Assay の感度、ダイナミックレンジ

## デュアルアッセイ

## MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay

(蛍光-発光:細胞生存性-細胞毒性)

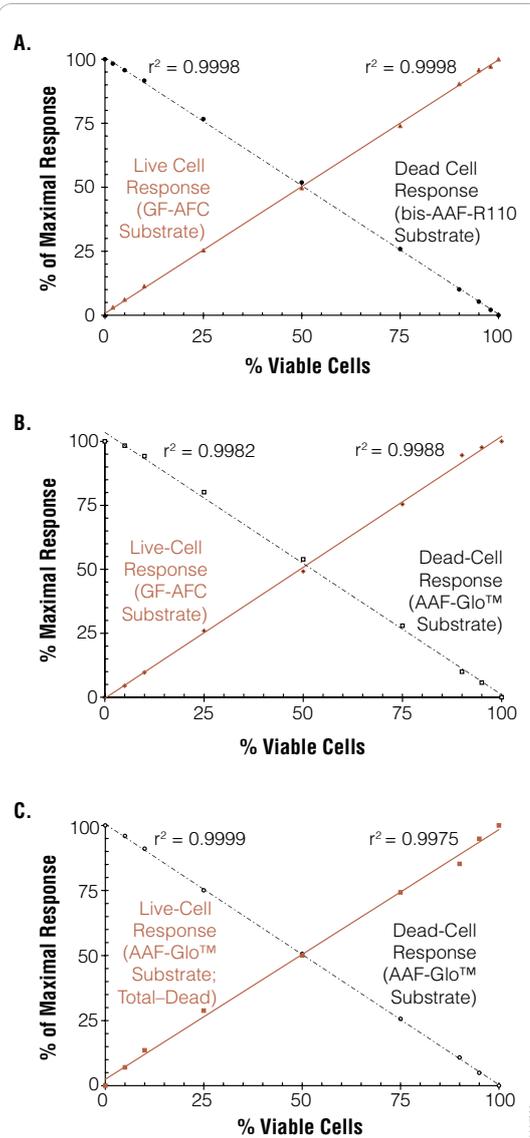
## MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay

(蛍光-蛍光:細胞生存性-細胞毒性)

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

製品名	サイズ	カタログ番号
<b>細胞生存性・毒性試験 (シングルアッセイ)</b>		
	10ml	G6080
CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay	5 × 10ml	G6081
	2 × 50ml	G6082
CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay	10ml	G9260
	5 × 10ml	G9261
	2 × 50ml	G9262
	10ml	G9290
CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay	5 × 10ml	G9291
	2 × 50ml	G9292

※ 10ml は 96 ウェルプレートで 100 ウェル分、384 ウェルプレートで 400 ウェル分。



## 各プロテアーゼマーカーを組み合わせたレシオメトリックな応答

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

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

※ 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。

# 実績のあるトラディショナルバイオマーカーによる 細胞生存 & 細胞毒性試験

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

マルチ 3D リアルタイム

### たった 2µl の培地より LDH を高感度に測定

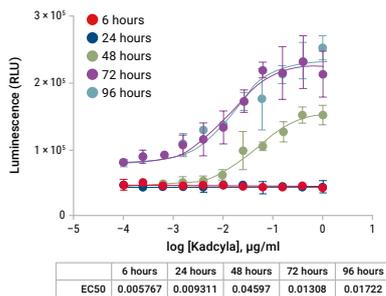
LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay は細胞膜の損傷により培地に放出される乳酸脱水素酵素 (LDH) をプレートベースで発光測定します。発光による測定は発色法や蛍光法に比べて高感度な検出を可能にするため、少数の細胞 (初代培養細胞や 3D 培養細胞を含む) から漏出する LDH でも正確に検出することができます。

このアッセイでは処理後の各ウェルより極少量の培地を使用するだけなので、長時間にわたり同じウェル中のサンプルからより多くのデータを取得できることができ、残った培地や細胞を利用して他の細胞ベースアッセイを行うこともできます。

- **極微量の培地より高感度に測定** : 培地 2-5 µl より高感度に LDH を定量でき、発色法・蛍光法に比べ高感度
- **リアルタイムアッセイも可能** : タイムポイントごとに培地を分取して経時的モニタリング
- **マルチアッセイで効率的** : 残った細胞、培地は他の実験で使用可能
- **3D 細胞にも対応**

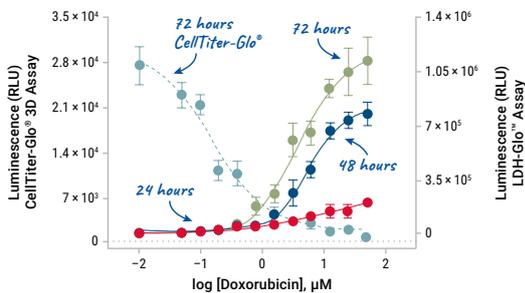


### アッセイプロトコル



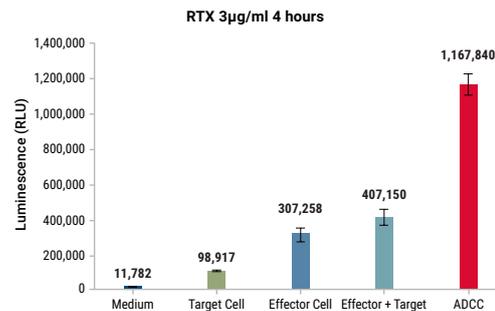
### 抗体薬物複合体 (ADC) による細胞死リアルタイムアッセイ

カドサイラ® (trastuzumab emtansine) を SKBR3 細胞に増量投与し最大 96 時間まで処理し、384 ウェルプレートフォーマットで LDH-Glo™ アッセイを行った。



### 3D 細胞毒性・生存性マルチアッセイ

ドキシソルピシンで処理した HCT116 スフェロイド (384 ウェルプレート : 2,500 個 / ウェル) を用いて LDH-Glo™ Assay (リアルタイム細胞毒性試験) と CellTiter-Glo® 3D (エンドポイント細胞生存性試験) で解析した。



### ADCC アッセイの例

エフェクター細胞 (PBMC) とターゲット細胞 (Daudi) を 20 : 1 の割合でプレートに播種し、リツキシマブ (RTX) で 4 時間処理した後、培地 2.5 µl を LDH Storage Buffer で希釈して 50 µl とし、半量をアッセイに使用した。エフェクター細胞またはターゲット細胞からの発光シグナルは最低限で、RTX を加えた ADCC (エフェクター細胞 + ターゲット細胞 + RTX) で劇的にシグナルが増加した。

製品名	サイズ	カタログ番号
細胞毒性試験 (LDH)		
発光法		
LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay	10ml	J2380
	50ml	J2381

※ 10ml は 96 ウェルプレートで 200 ウェル分に相当。

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

細胞膜にダメージを受けた細胞から漏出された乳酸脱水素酵素 (LDH) を、レサズリン/ジアホラーゼ共役系を介して生成するレゾルフィンの蛍光として定量することができます。細胞質局在分子の漏出を検出することにより、生存活性を失った細胞を測定する方法は各種あり、広く用いられている手法です。用事調製した CytoTox-ONE™ Reagent を細胞 / 培地を含む各ウェルに添加し、10 分間インキュベートを行った後、Stop Solution を加え、蛍光を測定 (励起波長 560nm、蛍光波長 590nm) します。

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

細胞上清に放出された LDH と 30 分間の酵素反応を行い、テトラゾリウム塩 (INT) から変換された赤色フォルマザンを 490nm で測定します。このアッセイは、エフェクター細胞によるターゲット細胞の溶解や、細菌・ウイルス・タンパク質・化学物質などによる細胞溶解など、細胞膜の完全性を測定する場合に使用します。

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

酸化還元色素であるレサズリンが生細胞により蛍光産物レゾルフィンに変換されることに基いています。アッセイあたりのコストが非常に低く、コストパフォーマンスに優れます。発色法でも検出可能ですが、感度は蛍光検出が優れます。

## CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (発色:細胞生存性)

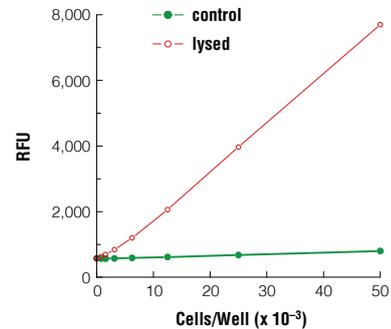
新しいテトラゾリウム化合物 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS)] と電子捕獲剤 phenazine ethosulfate (PES) が含まれます。MTS との共存下で PES がより安定化するため、便利な単一溶液にすることができました。他の MTT や INT のようなテトラゾリウム化合物と比較し、CellTiter 96® Aqueous One Solution Assay は作業行程を短縮することができます。

製品名	サイズ	カタログ番号
<b>細胞毒性試験 (LDH)</b>		
<b>蛍光法</b>		
CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay	200 ウェル分	G7890
	1000 ウェル分	G7891

※表示のサイズは 96 ウェルプレートの場合。

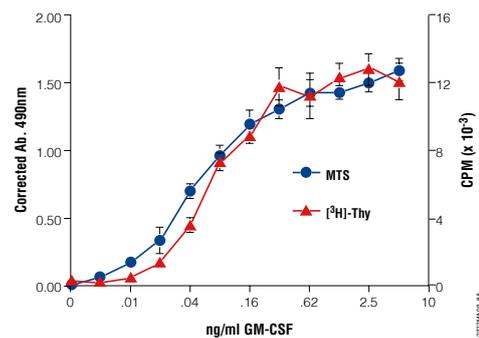
製品名	サイズ	カタログ番号
<b>発色法</b>		
CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	1000 ウェル分	G1780

※表示のサイズは 96 ウェルプレートの場合。



CytoTox-ONE™ を用いた細胞数と蛍光強度における直線性

96 ウェルプレートに 2 倍希釈系列で L929 細胞を添加し、Triton® X-100 で処理したものを "Lysed"、PBS を添加したものを "Control" とした。



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

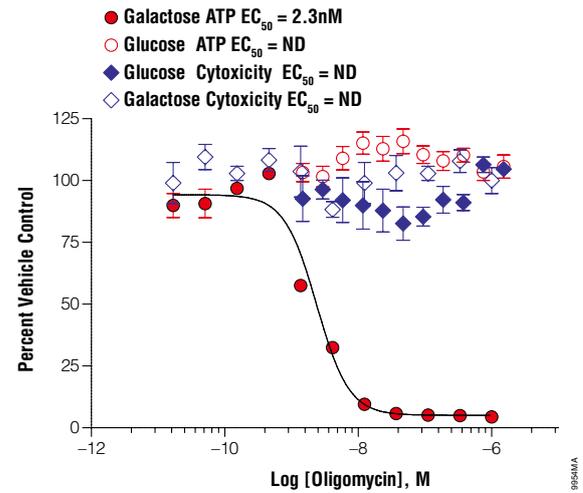
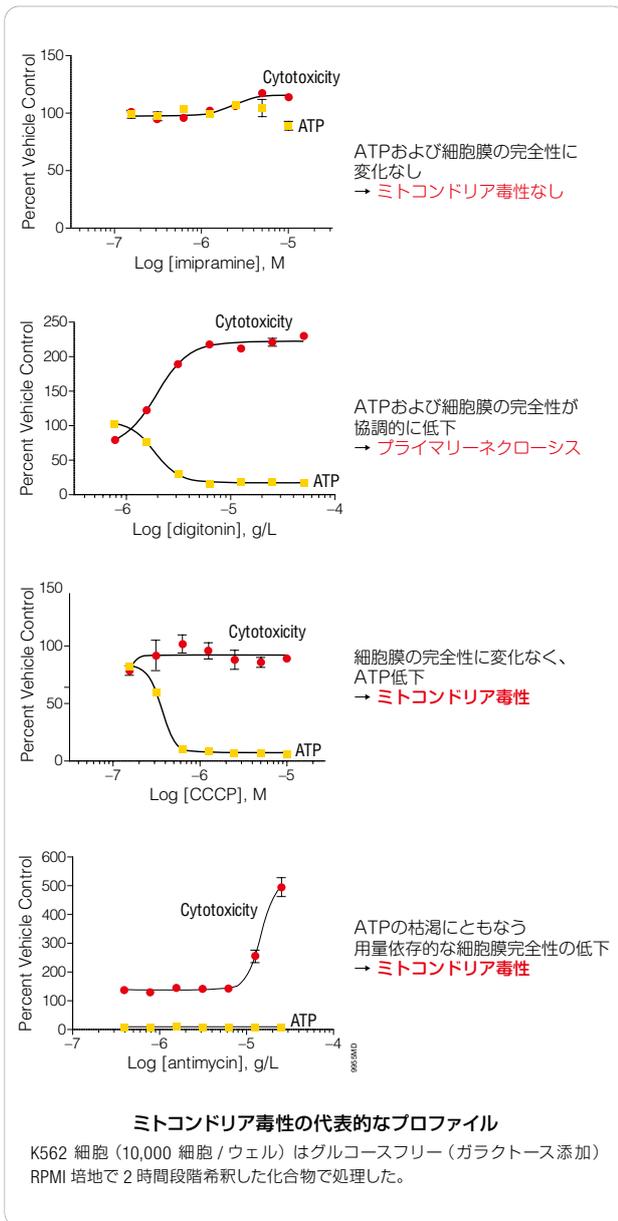
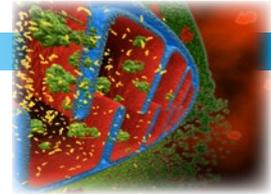
製品名	サイズ	カタログ番号
<b>細胞生存試験 (還元能)</b>		
<b>蛍光法</b>		
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	20ml	G8080
	100ml	G8081
	10 × 100ml	G8082
※ 20ml は 96 ウェルプレートで 1000 ウェル分、384 ウェルプレートで 400 ウェル分。		
<b>発色法</b>		
CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay	200 ウェル分	G3582
	1000 ウェル分	G3580
	5000 ウェル分	G3581
※表示のサイズは 96 ウェルプレートの場合。		

# ミトコンドリア毒性を簡便に検出

## Mitochondrial ToxGlo™ Assay

マルチアッセイでミトコンドリア機能障害性と細胞毒性を一挙に測定!

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



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

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

製品名	サイズ	カタログ番号
Mitochondrial ToxGlo™ Assay	10ml	G8000
	100ml	G8001

※ 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。

# アポトーシスおよび細胞死メカニズムを最も簡便に測定

リアルタイム - デュアルアッセイ

**RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis Assay** (発光: ホスファチジルセリン)

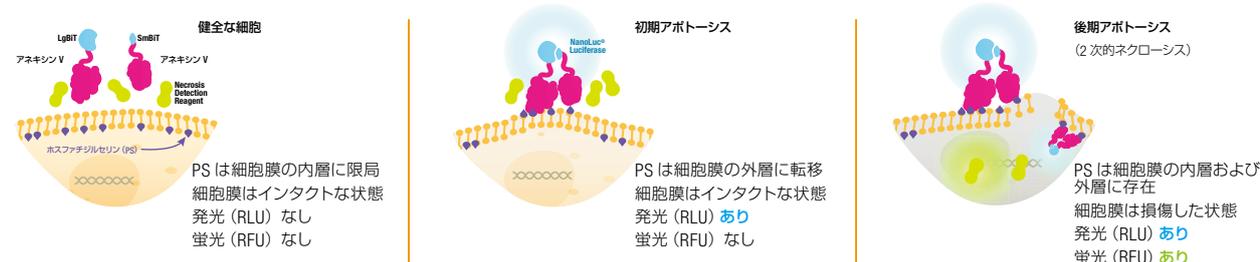
マルチ

3D

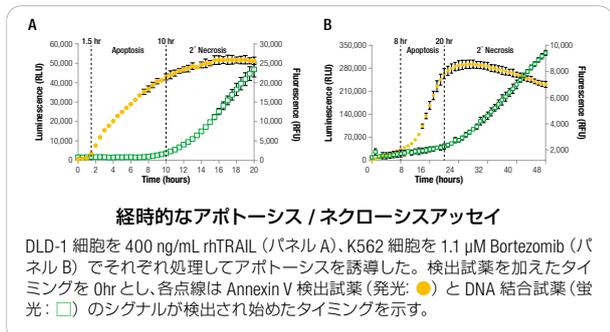
リアルタイム

## アポトーシスの進行をリアルタイムでモニタリング

RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay はアポトーシスの過程で細胞膜の外側に露出されるホスファチジルセリン (PS) をリアルタイムで測定することができます。本アッセイ試薬に含まれるアネキシン V - ルシフェラーゼ断片 (LgBiT または SmBiT) 融合タンパク質が初期アポトーシスで細胞表面に現れる PS に結合すると発光シグナルが検出されます。また、本試薬には細胞膜の完全性が損なわれると細胞内の DNA に結合し蛍光シグナルを生じる色素も含まれます。発光と蛍光シグナルの組み合わせとタイミングは、後期アポトーシスで起こる2次ネクローシスと他の細胞毒性イベントにより起こるネクローシスとを見分けるために利用することができます。このアッセイは細胞を溶解せず、簡便な "添加 - 測定" だけの方法なので1つのアッセイウェルより複数回にわたり測定を行うことができます。何枚ものプレート、複雑な工程、特殊な検出装置を必要とせずにアポトーシスをリアルタイムでモニタリングすることができます。定量には発光と蛍光を検出できるマルチモードリーダーのみが必要です。



RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay の原理



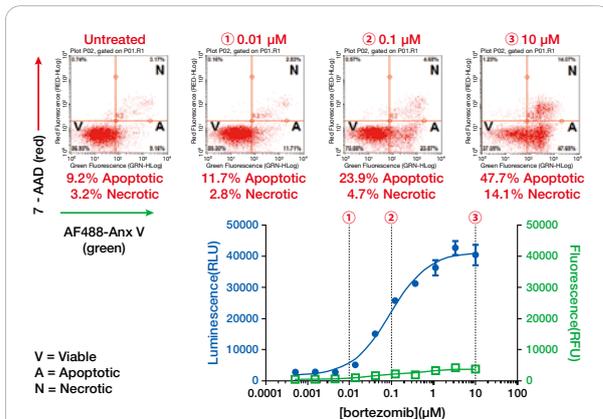
- **簡単な測定プロトコル**: Add to Measure の簡単プロトコル・最大 48 時間までの経時的なアッセイが可能。
- **フローサイトメーター不要**: 発光測定と蛍光測定に対応したプレートリーダーにて簡便に測定可能! Throughput も格段にアップ!
- **様々なサンプルでの応用例**: 通常の 2 次元培養サンプルに加え、3 次元培養サンプルや共培養アッセイ (CTL アッセイ) にも応用可能。

製品名	サイズ	カタログ番号
<b>Annexin V アッセイ (発光)</b>		
RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay (アポトーシス & ネクローシス デュアルアッセイ)	100 回分	JA1011
	1000 回分	JA1012
RealTime Glo™ Annexin V Apoptosis Assay (アポトーシス シングルアッセイ)	100 回分	JA1000
	1000 回分	JA1001

\* 100 回分は 96 ウェルプレートで 100 ウェル分、384 ウェルプレートで 400 ウェル分に相当。

### RealTime-Glo™ Annexin V および 発光イメージングシステム LV200 を用いた発光 & 蛍光イメージング

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。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。



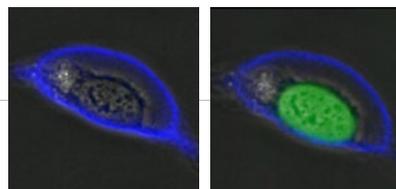
### フローサイトメトリーとの整合性

#### RealTime™ Glo Annexin V Assay とフローサイトメトリーの結果

本実験では K562 細胞を様々な濃度のボルテゾミブに 16 時間暴露した。

**上パネル**: 細胞を採取、洗浄した後に Alexa Fluor® 488 (緑色蛍光, PS:AnxV 結合) および 7-AAD (赤色蛍光, 細胞膜の完全性) で標識し、フローサイトメトリー (10,000 イベント) により分析した。

**下パネル**: K562 細胞 (10,000/ウェル) を RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis Assay reagent 存在下で段階希釈したボルテゾミブに暴露した。発光 (PS:AnxV 結合) および蛍光 (細胞膜の完全性) を動力学的に記録した。ボルテゾミブで 16 時間インキュベーションした細胞のデータ。



<オリオンパス社のご厚意によりデータ提供>  
www.premega.co.jp/movie/annexin\_v\_sgicel/



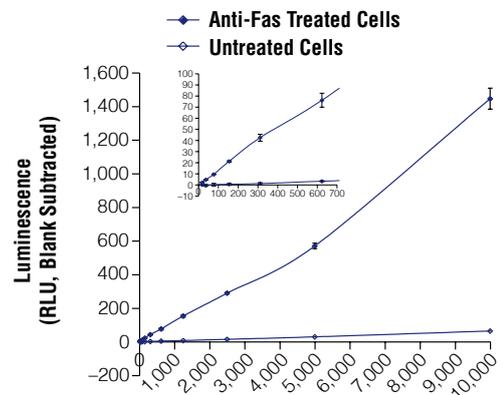
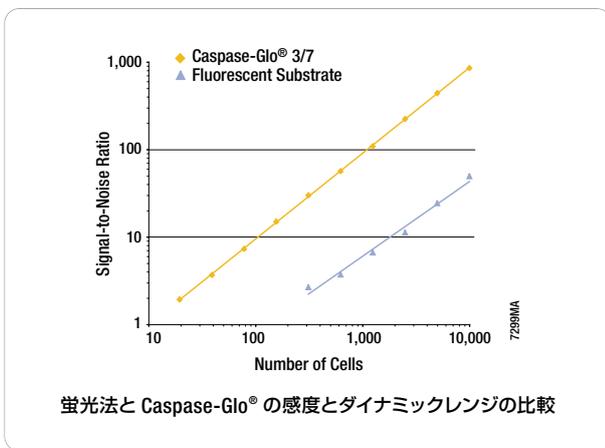
# アポトーシスおよび細胞死メカニズムを最も簡便に測定 (続き)

## シングルアッセイ

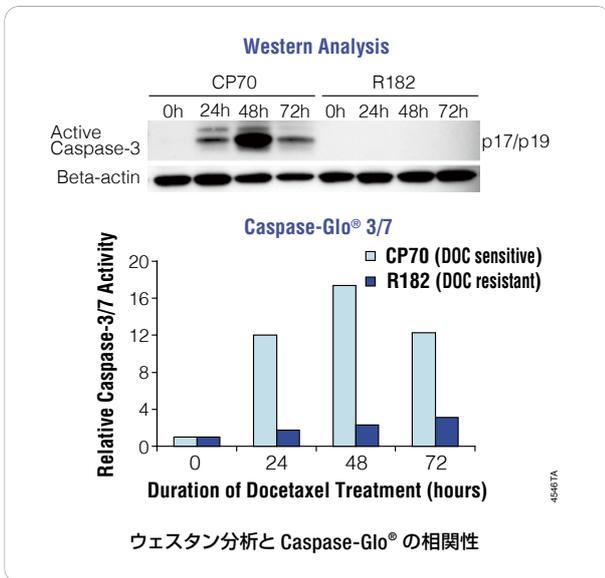
### Caspase-Glo® Assay (発光:カスパーゼ 3/7) マルチ 3D

#### 高感度でシンプルなカスパーゼアッセイシステム

Caspase-Glo® Assays は、各種カスパーゼ活性を測定するためのホモジニアスフォーマット発光アッセイシステムです。本アッセイでは、プロテアーゼ認識配列を付加した発光基質アミノルシフェリンと特殊な耐熱性ルシフェラーゼを含む試薬がベースになっており、カスパーゼ活性に最適化されています。Caspase-Glo® Reagent を添加すると細胞が溶解し、続いてカスパーゼにより基質が切断されます。遊離したアミノルシフェリンは耐熱性の Ultra-Glo™ Recombinant Luciferase により消費され、カスパーゼ活性に比例した“グロータイプ”の発光シグナルを生じます。本アッセイは、蛍光法や発色法のアッセイよりも高感度で、アポトーシスを判定する TUNEL 法、抗体法などに比べ飛躍的に簡便になっています。Caspase-Glo® 8 および 9 Assays には、非特異的なバックグラウンドをより低減するプロテアーゼ阻害剤 MG-132 が新たに添付されています。また、新規な細胞生存性および細胞毒性マーカーと組み合わせたマルチアッセイシステム (ApoTox-Glo™ & ApoLive-Glo™ : 次ページ参照) により細胞死のメカニズムを調べることもできます。



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。



製品名	サイズ	カタログ番号
<b>カスパーゼアッセイ (発光)</b>		
Caspase-Glo® 3/7 Assay	2.5ml	G8090
	10ml	G8091
	100ml	G8092
Caspase-Glo® 3/7 3D Assay (各種 3D 培養細胞用 プロトコル)	10ml	G8981
	100ml	G8982
	10 × 10ml	G8983
Caspase-Glo® 8 Assay	2.5ml	G8200
Caspase-Glo® 9 Assay	10ml	G8201
	2.5ml	G8210
	10ml	G8211

※ 10ml は 96 ウェルプレートで 100 ウェル分。  
 ※ 3/7 Assay と 3/7 3D Assay の試薬は同じで、プロトコルが異なります。

製品名	サイズ	カタログ番号
<b>アポトーシス + 細胞生存性 + 細胞毒性アッセイ (蛍光 &amp; 発光)</b>		
<b>トリプルアッセイ</b>		
ApoTox-Glo™ Triplex Assay	10ml	G6320
	5 × 10ml	G6321
<b>デュアルアッセイ</b>		
ApoLive-Glo™ Multiplex Assay	10ml	G6410
	5 × 10ml	G6411

※ 10ml は 96 ウェルプレートで 100 ウェル分。

### Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay (発光:カスパーゼ 3/7) マルチ 3D

蛍光基質 Z-DEVD-rhodamine 110 によりカスパーゼを測定します。カスパーゼ 3/7 の定量には精製された酵素や細胞抽出液、培養細胞 (付着細胞・浮遊細胞・初代培養細胞) をサンプルとして使用します。発光法の Caspase-Glo® 8 または 9 を組み合わせたアポトーシスメカニズムの解析にも使用することができます。

製品名	サイズ	カタログ番号
<b>カスパーゼアッセイ (発光)</b>		
Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay	1ml	G7792
	10ml	G7790
	100ml	G7791

※ 10ml は 96 ウェルプレートで 100 ウェル分。

トリプルアッセイ

**ApoTox-Glo™ Triplex Assay**

(蛍光 - 発光 : 細胞生存性 - 細胞毒性 - アポトーシス)

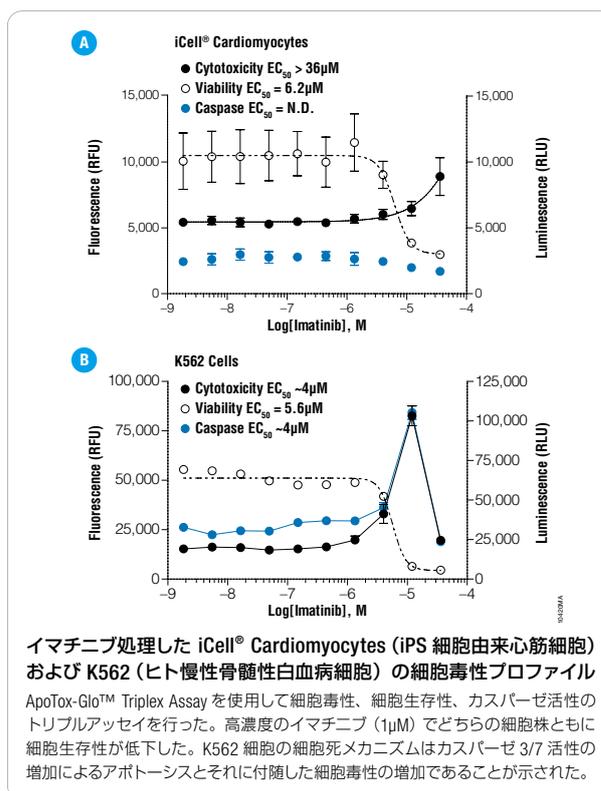
培養細胞を含む単一のウェルから細胞生存性 / 毒性 / アポトーシスの各イベントについて容易に評価するための3つのアッセイケミストリを組合せたシステムです。細胞毒性および細胞生存性に対する新規なプロテアーゼ活性を蛍光で測定 (10 ページ参照) し、カスパーゼ 3/7 活性は発光法により測定します (Caspase-Glo® 3/7)。1つのサンプルから細胞死のメカニズムを決定することができます (右図参照)。

デュアルアッセイ

**ApoLive-Glo™ Multiplex Assay**

(蛍光 - 発光 : 細胞生存性 - アポトーシス)

細胞生存マーカーとして生細胞プロテアーゼ (10 ページ参照) を、アポトーシスマーカーとしてカスパーゼの活性化 (Caspase-Glo® 3/7) を1ウェルで測定し、細胞死のメカニズムを決定することができます。カスパーゼ活性と生存細胞の比率はカスパーゼ活性化量の決定および細胞数に対する補正に有用です。



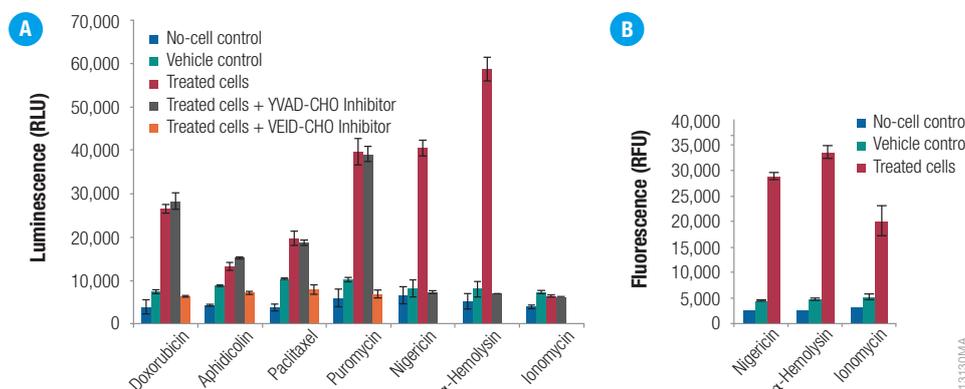
イマチニブ処理した iCell® Cardiomyocytes (iPS 細胞由来心筋細胞) および K562 (ヒト慢性骨髄性白血病細胞) の細胞毒性プロファイル  
 ApoTox-Glo™ Triplex Assay を使用して細胞毒性、細胞生存性、カスパーゼ活性のトリプルアッセイを行った。高濃度のイマチニブ (1µM) でどちらの細胞株ともに細胞生存性が低下した。K562 細胞の細胞死メカニズムはカスパーゼ 3/7 活性の増加によるアポトーシスとそれに付随した細胞毒性の増加であることが示された。

**炎症性細胞死 (パイロトーシス) : インフラマソーム / カスパーゼ -1 測定**

**Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay (発光 : カスパーゼ 1) マルチ**

ウェスタンブロットングや ELISA 法より簡便で多検体処理に最適なカスパーゼ 1 測定

Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay は、インフラマソーム活性化の主要なバイオマーカーであるカスパーゼ 1 の活性を選択的に測定するホモジニアス発光アッセイです。カスパーゼ -1 の活性化により 1) プロセッシングとサイトカイン IL-1β および IL-18 の放出, 2) パイロトーシス [pyroptosis] (炎症性細胞死) が起こります。本試薬 1 回の添加で細胞溶解、カスパーゼ 1 による基質 (Z-WEHD-アミノルシフェリン) の切断、特殊な耐熱性組換えエルシフェラーゼ (Ultra-Glo™) によりカスパーゼ活性に比例した安定な発光シグナルを生じます。プロテアソーム阻害剤 MG-132 が試薬に含まれるため、プロテアソームを介した非特異的な基質の切断を防ぎ、カスパーゼ 1 活性の高感度アッセイを可能にします。



Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay によるアポトーシス、ネクローシスと区別されたインフラマソーム活性測定

**パネル A.** THP-1 細胞を培養し、アポトーシス誘導剤 (ドキシソルピシン、アフィジコリン、バクリタキセル、ピューロマイシン) で 18 時間処理した。同様に 2 枚目のプレートでは、インフラマソーム誘導剤 (ニゲリシン、α - ヘモリジン) またはネクローシス誘導剤 (イオノマイシン) で 2 時間処理した。Caspase-Glo® 1 Reagent に YVAD-CHO (カスパーゼ 1 阻害剤) または VEID-CHO inhibitor (カスパーゼ 6 阻害剤) を添加して測定した。**パネル B.** CellTox™ Green Cytotoxicity Reagent はニゲリシン、α - ヘモリジンおよびイオノマイシンと同時に添加し、Caspase-Glo® 1 Reagent を加える直前に蛍光を測定した。

製品名	サイズ	カタログ番号
<b>カスパーゼ 1 アッセイ (発光)</b>		
Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay	10ml	G9951
	5 × 10ml	G9952

※ 10ml は 96 ウェルプレートで 100 ウェル分。

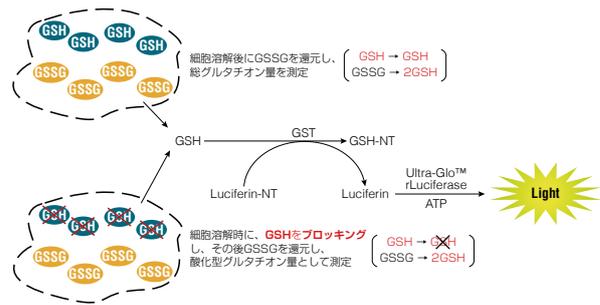
# 酸化ストレス: GSH & GSSG の測定

## GSH/GSSG-Glo™ Assay マルチ

### 除タンパク操作の不要な高感度グルタチオンアッセイ

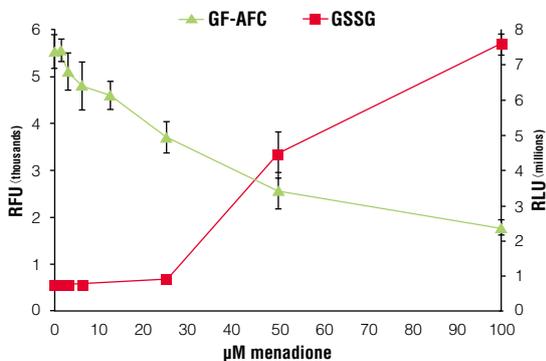
化合物には細胞内の活性酸素の発生を誘導するものが多く存在し、その結果与えられる細胞へのダメージにより最終的にアポトーシスやネクローシスを起こす場合もあります。還元型と酸化型のグルタチオンの比率 (GSH/GSSG 比) を求めることで、これらの化合物による細胞内酸化還元電状態の変化量を調べることができます。GSH/GSSG-Glo™ Assay は、培養細胞内の総グルタチオン (GSH + GSSG)、GSSG、GSH/GSSG 比を簡単に検出、定量するための発光アッセイシステムです。培養ウェル内の細胞で直接定量できるため GSH や GSSG のロスが最小限に抑えられバラツキが低減します。

- **生体に近い GSH/GSSG 比**: 総グルタチオンや GSSG の実質レベルを細胞培養ウェルで直接測定できるので、従来法に比べて GSH や GSSG のロスを抑えサンプルの調製作業や間接的な GSSG 算出も必要ありません。
- **頑健なパフォーマンス**: 生物発光技術およびシンプルなプロトコルにより、サンプルのハンドリングやバラツキが低減。
- **シンプルなプロトコル**: マルチウエルプレート内の細胞に直接試薬を添加する“ホモジニアスな”添加 - 混和 - 測定”形式で、従来法のような時間のかかる除タンパクや遠心操作が不要。
- **高い感度**: 感度が高いので従来法よりも少数の細胞でアッセイが可能
- **自動化が容易**: グロータイプの高時間発光 (半減期 2 時間以上) なので 96 あるいは 384 ウェルプレートでの自動化が可能
- **蛍光による干渉がありません**: 感度が高いので従来法よりも少数の細胞でアッセイが可能



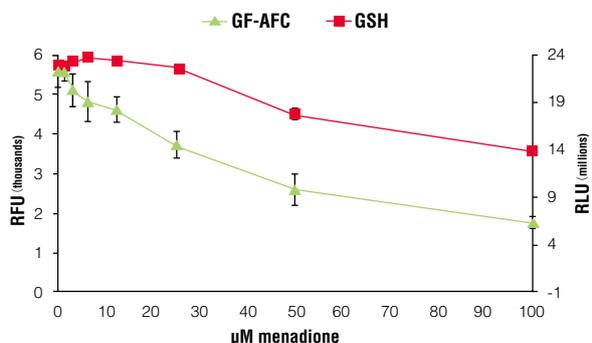
### GSH/GSSG-Glo™ の測定原理

GSH 依存的に Luciferin-NT (GSH プローブ) がグルタチオン-S-トランスフェラーゼによりルシフェリンへ変換される反応とホタルルシフェラーゼ反応のカップリングに基づく。総グルタチオンと GSSG の決定は並行して実施することができます。総グルタチオンの測定は還元剤を用いて細胞ライセートに含まれるすべてのグルタチオン (GSH および GSSG) を還元型の GSH に変換して測定。酸化型の GSSG のみの測定はライセートに含まれるインタクトな GSSG を GSH と分けるために全ての GSH をブロックする試薬を加え、残った GSSG を GSH に変換して発光反応で定量。



### メナジオン濃度にもなる GSH、GSSG レベルおよび細胞生存性の変化

肺癌細胞 A549 細胞 5,000 個 / ウェル (96 ウェルプレート) をメナジオンで 30 分間処理した後、CellTiter-Fluor™ (GF-AFC) で細胞生存性を測定した。続いて、GSH/GSSG-Glo™ を用いて GSSG および GSH を測定した。



製品名	サイズ	カタログ番号
グルタチオンアッセイシステム (発光)		
酸化型・還元型・比率		
GSH/GSSG-Glo™ Assay	10ml	V6611
	50ml	V6612

※ 10ml は 96 ウェルプレートで 100 ウェル分 (総グルタチオンまたは GSSG 100 ウェル分、GSH/GSSG 比の決定なら 50 ウェル分)。

製品名	サイズ	カタログ番号
グルタチオンアッセイシステム (発光)		
還元型		
GSH-Glo™ Glutathione Assay	10ml	V6911
	50ml	V6912

※ 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。

# 活性酸素：H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の測定

## ROS-Glo™ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Assay マルチ

### HRP 法に比べ飛躍的に偽陽性が低減した高感度な H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> アッセイ

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は培養細胞が有する活性酸素種 ROS の中で半減期が最も長く、酸化ストレスのバイオマーカーに適しています。また、生体中では様々な ROS が H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に変換されるため、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 量の変化は全体的な ROS レベルの変化を示すものとなり得ます。ROS-Glo™ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Assay は活性酸素種 (ROS) である過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) レベルを測定する迅速で高感度なホモジニアス生物発光アッセイで、培養細胞あるいは特定の酵素反応より直接測定することができます。ルシフェリン誘導体基質をサンプルとともにインキュベートすると H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と直接反応してルシフェリン前駆体が生成されます。ROS-Glo™ Detection Solution の添加によりこの前駆体がルシフェリンに変換され、試薬に含まれる Ultra-Glo™ Recombinant Luciferase がサンプル中に存在する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> レベルに比例した発光シグナルを生じます。

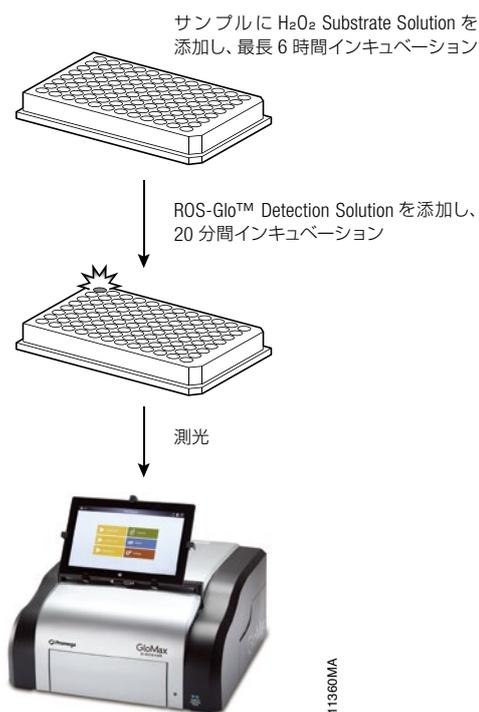
#### 細胞でも酵素でも使用可能

- 培養細胞サンプルの H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> レベル変化の直接的な測定に
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を生成あるいは消費する酵素活性の測定に

#### 簡便、迅速、多検体処理にも最適

- 細胞内 ROS レベルを変化させる低分子阻害剤 / 誘導剤の評価に
- HPR を使用しないため、HRP 阻害剤による偽陽性が排除されます

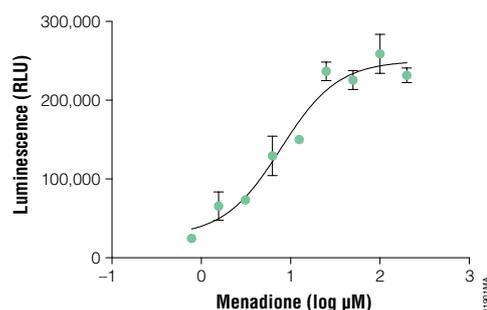
### ROS-Glo™ Assay の操作概要



### ROS-Glo™ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と一般的な HRP 法 (蛍光) による低分子スクリーニングの偽陽性率の比較

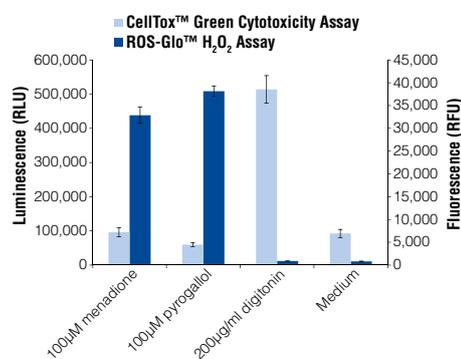
	ROS-Glo™ Assay		HRP 法	
	化合物の数	LOPAC に占める割合 (%)	化合物の数	LOPAC に占める割合 (%)
スクリーニングに用いた化合物数	1,280	—	1,280	—
インヒビター：活性 75% 以下	6	0.5	91	7.1
インヒビター：活性 50% 以下	3	0.2	67	5.2
アクチベーター：活性 150% 以上	2	0.2	0	0

10 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に LOPAC-1280 を添加し、ROS-Glo™ Assay と他社 HRP 法で測定を行った。HRP 法では 7.1% の化合物が系に影響を与えたのに対し、ROS-Glo™ Assay では 0.5% であった。



#### 培養細胞における ROS の誘導

384 ウェルプレートで培養した K562 細胞に濃度を増加させながらメナジオンで処理し、その間に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Substrate を加えた。2 時間のインキュベーションの後、等量の ROS-Glo™ Detection Solution を添加し、さらに 20 分間インキュベーションして測光した。



#### ROS-Glo™ Assay と細胞毒性試験のマルチアッセイ

384 ウェルプレートに HepG2 細胞を 2,000 細胞 / ウェルで播種し、100μM メナジオン、100μM ピロガロールまたは 200μg/ml ジギトニンで 2 時間処理した (1X CellTox™ Green Dye および 25μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Substrate も添加)。インキュベーション後、CellTox™ Green (細胞毒性) の蛍光シグナルを測定し、等量の ROS-Glo™ Detection Solution を添加して 20 分後に測光した。

製品名	サイズ	カタログ番号
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> アッセイ (発光)</b>		
ROS-Glo™ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Assay <span style="font-size: small;">(調)</span>	10ml	G8820
	50ml	G8821

※ 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。

(調) : 「毒物及び劇物取締法」に基づく医薬用外劇物です。法規制に従って、保管、廃棄等を行って下さい。

## エ エネルギー代謝：糖・グルタミン・脂質代謝物の測定

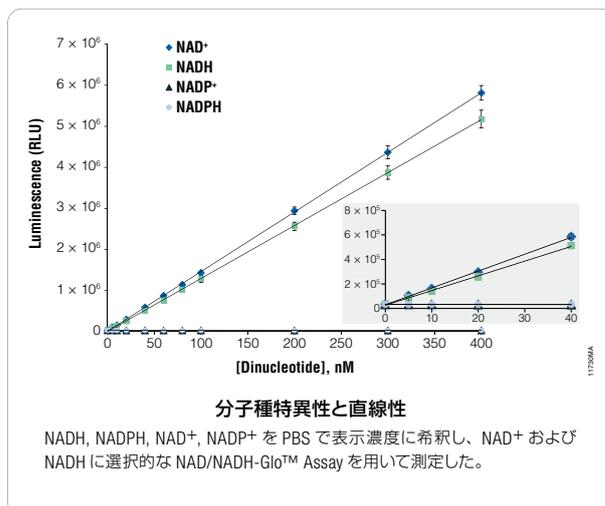
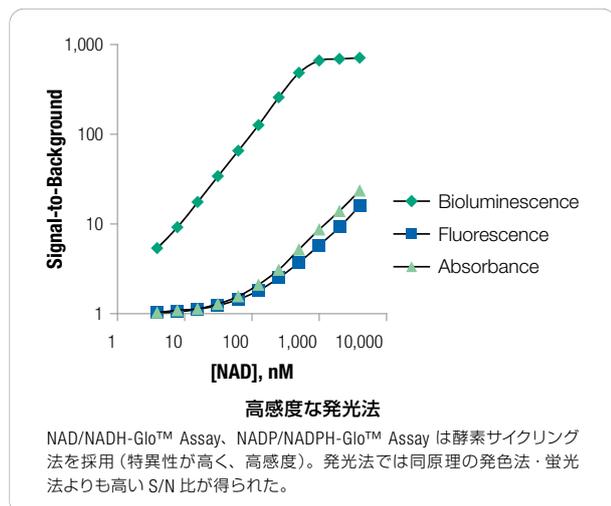
がんや糖尿病などの疾患では細胞内の代謝が大きく変化していることが明らかとなり、疾患メカニズムの解明や薬剤開発において代謝物を簡便、高感度に検出する手法が望まれています。プロメガの NADH 発光アッセイ法および特異的なデヒドロゲナーゼとを組み合わせた種々の代謝物アッセイはマルチウェルプレートに試薬を加えるだけの簡便なプロトコルで、高感度に測定することができるようになりました。

### NADP/NADPH-Glo™ and NAD/NADH-Glo™ Assay マルチ 3D

#### ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを高い選択性と感度で検出

NAD/NADH-Glo™ Assay および NADP/NADPH-Glo™ Assay は、細胞などの生物学的サンプルよりニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(非リン酸化型：NAD<sup>+</sup> [酸化型] あるいは NADH [還元型]) またはニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸(リン酸化型：NADP<sup>+</sup> [酸化型] あるいは NADPH [還元型]) の全量あるいは酸化型と還元型の比率を検出するためのホモジニアスな生物発光アッセイで、1種類の試薬を添加するだけの簡単なシステムです。

各システムに含まれる Cycling Enzyme がサンプルに含まれる NAD<sup>+</sup> または NADP<sup>+</sup> を還元型に変換し、次にキットに含まれるレダクターゼがプロルシフェリン基質をルシフェリンに還元します。このルシフェリンと Ultra-Glo™ Recombinant Luciferase により生じた発光シグナルはサンプルに含まれる非リン酸化型 (NAD<sup>+</sup>/NADH) またはリン酸化型 (NADP<sup>+</sup>/NADPH) の総量に比例します。付属プロトコルにより NAD/NADH-Glo™ Assay では NAD<sup>+</sup> および NADH を、NADP/NADPH-Glo™ Assay では NADP<sup>+</sup> および NADPH を区別して測定することができ、それぞれの酸化型と還元型の比率を算出することができます。“添加 - 混和 - 測定” だけのシンプルなプロトコルとスケール自在の測定ケミストリにより NAD/NADH または NADP/NADPH に対する低分子化合物のハイスループットモニタリングに最適です。

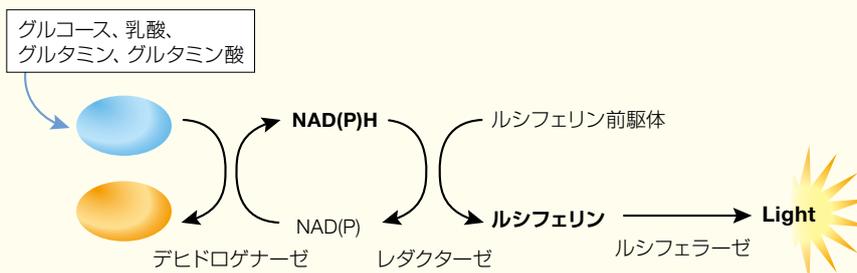


製品名	サイズ	カタログ番号
<b>NAD アッセイ (発光)</b>		
NAD/NADH-Glo™ Assay	10ml	G9071
	50ml	G9072
NADP/NADPH-Glo™ Assay	10ml	G9081
	50ml	G9082

※ 10ml は 96 ウェルプレートで 100 ウェル分。

## プロメガの代謝アッセイの測定プラットフォーム

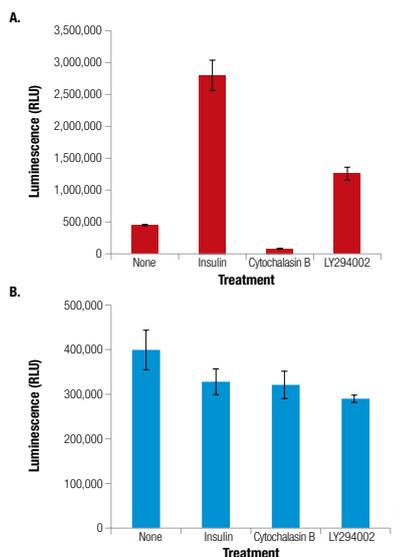
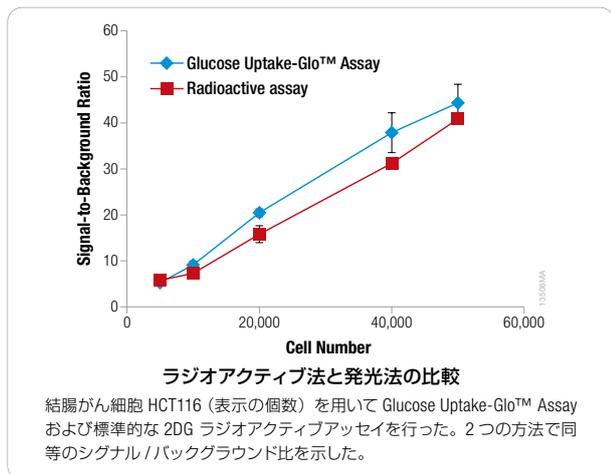
代謝産物や栄養成分に対する特異的デヒドロゲナーゼとレダクターゼを用いた方法により、代謝産物・栄養成分を発光シグナルに変換して測定 (次ページ参照)。



グルコースの取込み

**Glucose Uptake-Glo™ Assay** マルチ 3D

グルコースの取込み試験はこれまで放射性標識、蛍光または吸光により取り込み活性の測定が行われてきましたが、従来法では煩雑な操作性、感度やバックグラウンドなどに問題がありました。Glucose Uptake-Glo™ Assay は従来法と同じく、蓄積された 2-デオキシグルコース-6-リン酸 (2DG6P) を測定しますが、発光シグナルに変換することで高感度にグルコースの取り込み量を測定します。操作法も簡便で細胞の洗浄や除タンパクが不要になり、試薬加えるだけの簡便な測定が可能になりました。



リアルタイム細胞生存試験とのマルチアッセイ

3T3L1-MBX 脂肪細胞を用いた同一ウェルでの Glucose Uptake-Glo™ Assay (パネル A) と RealTime-Glo™ Cell Viability Assay (パネル B) のマルチアッセイ。3T3L1-MBX 脂肪細胞に様々な処理を行い製品プロトコルに従いアッセイを行った。条件によってグルコース取込み量に大きな差が表れたが細胞生存性の変化は最小限。

製品名	サイズ	カタログ番号
<b>グルコース取込みアッセイ (発光)</b>		
Glucose Uptake-Glo™ Assay	5ml	J1341
	10ml	J1342
	50ml	J1343

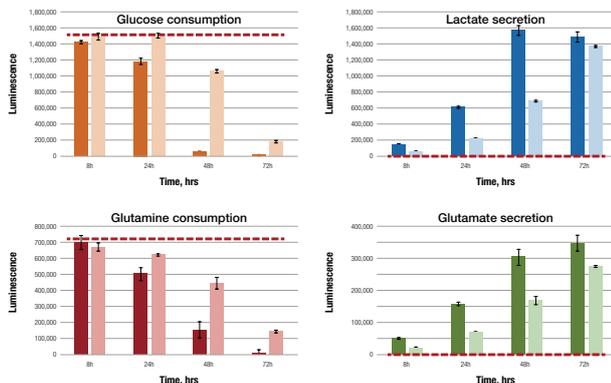
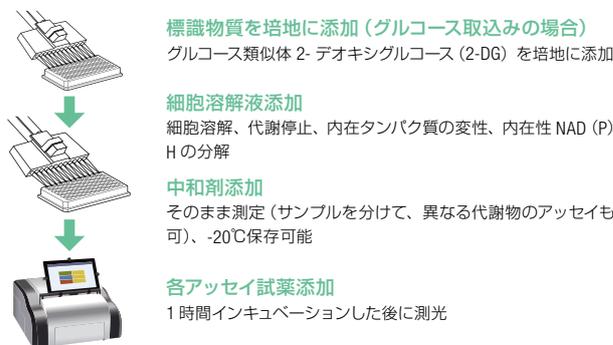
※ 10ml は 96 ウェルプレートで 100 ウェル分。

糖・グルタミン代謝産物の測定 (グルコース、乳酸、グルタミン、グルタミン酸)

マルチ 3D リアルタイム

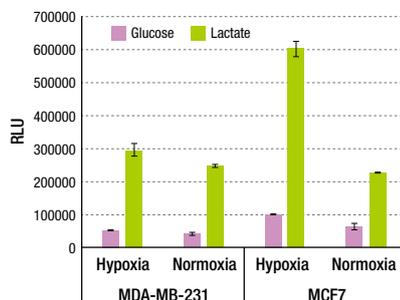
**Glucose-Glo™ Assay**  
**Lactate-Glo™ Assay**  
**Glutamate-Glo™ Assay**  
**Glutamine/Glutamate-Glo™ Assay**

これまで代謝産物の測定は質量分析など煩雑な方法などに限られ、多検体を簡便に処理する方法はほとんどありませんでした。プロメガ NAD 発光測定法をベースとした簡便な測定法で、細胞内や培地中の代謝物を測定することができます。がんや糖尿病の研究で注目される糖代謝やグルタミン代謝を標的とした化合物スクリーニングなどに最適です。



培地中の代謝物の測定

A549 細胞を 96 ウェルプレートに 15,000 個 (濃い棒グラフ) または 5,000 個 (薄い棒グラフ) 播種 (培地: 5mM グルコース、2mM グルタミンおよび 10% 透析済み血清を含む DMEM)。表示時間に培地を分取して PBS で希釈し、それを分けてそれぞれグルコース、乳酸、グルタミン、グルタミン酸を測定。赤い点線は培地コントロール (細胞無し)。



発光テクノロジーを用いた代謝シフトの解析

乳がん細胞株 MDA-MB-231 細胞と MCF7 細胞を通常酸素分圧下 (約 20% O<sub>2</sub>) および低酸素条件下 (3% O<sub>2</sub>) でそれぞれ培養し、細胞内グルコース量と分泌された乳酸量を比較した。MCF7 細胞では低酸素条件下で培養することにより、乳酸の産生量が亢進し、解糖系への代謝シフトが観察された。一方で、MDA-MB-231 細胞では代謝経路の変化は観察されていない。

製品名	サイズ	カタログ番号
<b>代謝産物アッセイ (発光)</b>		
Glucose-Glo™ Assay	5ml	J6021
Lactate-Glo™ Assay	5ml	J5021
Glutamate-Glo™ Assay	5ml	J7021
Glutamine/Glutamate-Glo™ Assay	5ml	J8021

各製品の大容量品の価格、詳細は Web でご覧いただけます。

# エ エネルギー代謝：糖・グルタミン・脂質代謝物の測定 (続き)

脂質代謝物の測定  
(グリセロール、トリグリセリド、コレステロール/コレステロールエステル)

マルチ

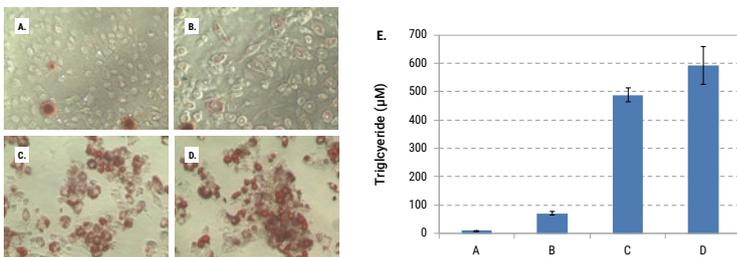
3D

## Glycerol-Glo™ Assay Triglyceride-Glo™ Assay Cholesterol/Cholesterol Ester-Glo™ Assay

プロメガ脂質代謝アッセイは、グリセロール、トリグリセリド、コレステロールおよびコレステロールエステルを定量するための高感度でシンプルな方法を提供します。これらのアッセイは、生物学的プロセスの中でも、脂肪分解および脂肪生成の定量化に使用することができます。脂質代謝アッセイは、他のプロメガ代謝アッセイでも採用されている生物発光技術をベースにしています。

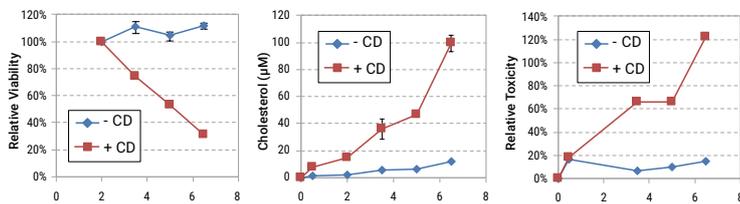
脂質代謝アッセイは培養細胞、組織、培地、血漿、血清など、多くの生体サンプルに適応でき、細胞タイプとしては、単層および 3D 培養した肝細胞および脂肪細胞なども含まれます。このプロトコルでは、面倒な有機抽出ステップが不要なので、サンプル調製が飛躍的に簡素化されます。また、このアッセイは広い直線性を示すとともに感度も高いため、サンプルを希釈する手間を低減し、脂質代謝産物の微小な変化を簡便にとらえることができます。

- **有機溶媒による抽出不要**: のプレートベースのアッセイに含まれる面倒な有機溶媒抽出ステップは不要
- **定量的なデータ**: 定性的な染色イメージよりも結果が明瞭な定量的情報を取得可能
- **プレートベース**: アッセイはハイスループット分析に対応
- **広いダイナミックレンジ**: レンジ内に収めるために何度も希釈する必要はありません



脂肪細胞分化にともなう脂質の蓄積

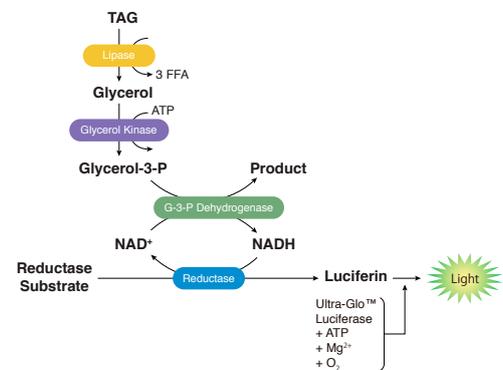
96-ウェルプレートで、3T3L1-MBXにおける脂質の蓄積を分化の指標として線維芽細胞(パネルA, 5日目)から分化ステージ1(パネルB, 12日目)、分化ステージ2(パネルC, 14日目)、成熟した脂肪細胞(パネルD, 21日目)までをモニタリングした。1セットのプレートは Oil Red O (パネルA-D) で染色し、その他は Triglyceride-Glo™ Assay プロトコルに従いアッセイした(パネルE)。



β-シクロデキストリン添加後の培地中コレステロールおよび細胞生存性、細胞毒性のマルチプレックスアッセイ

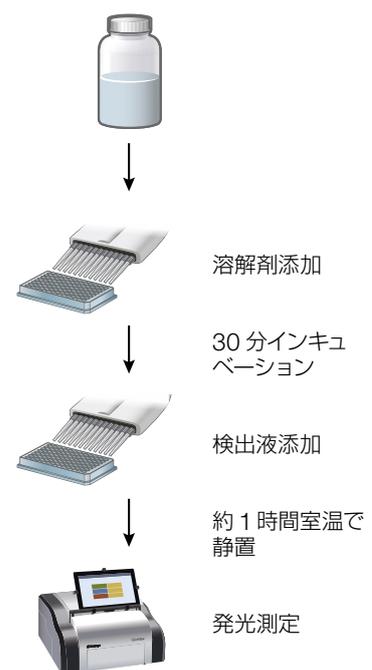
HCT116 結腸がん細胞をウェルあたり 2000 個 96 ウェルプレートに播種し、20mM メチル-β-シクロデキストリン存在下(青色)または非存在下(赤色)、表示の時間に RealTimeGlo™ Assay による細胞生存性、分取した培地で Cholesterol/Cholesterol Ester-Glo™ Assay でコレステロール量を、LDH-Glo™ Assay で細胞毒性を測定した。

製品名	サイズ	カタログ番号
<b>グリセロールアッセイ</b>		
Glycerol-Glo™ Assay	5ml	J3150
	50ml	J3151
<b>トリグリセリドアッセイ</b>		
Triglyceride-Glo™ Assay	5ml	J3160
	50ml	J3161
<b>コレステロール/コレステロールエステルアッセイ</b>		
Cholesterol/Cholesterol Ester-Glo™ Assay	5ml	J3190
	50ml	J3191



発光アッセイの測定原理

上図は Triglyceride-Glo™ Assay および Glycerol-Glo™ Assay の測定原理。Cholesterol/Cholesterol Ester-Glo™ Assay の場合はコレステロールエステルがエステラーゼによりコレステロールに変換され、さらにコレステロールデヒドロゲナーゼにより NADH が再生される。



代謝マーカーの測定操作

# タンパク質分解：オートファジーフラックスとプロテアソーム

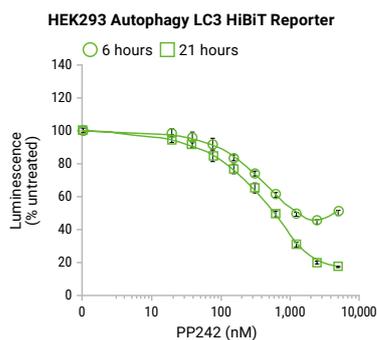
## Autophagy LC3 HiBiT Reporter Assay マルチ 3D

### オートファジーフラックス高感度レポーターアッセイ

オートファジーは余剰あるいは有害な細胞内のタンパク質などを分解する重要な細胞内パスウェイです。平常あるいはストレス誘導条件下における細胞の健全性を維持する上で重要です。現在のオートファジーのモニタリングは主に煩雑なフローサイトメトリーやイメージングで行われており、定量性にも限界があります。プロメガではプレートベースで“添加 – 混和 – 測定”するだけの新規なオートファジーフラックスの定量レポーターシステムを開発しました。このレポーターシステムは簡便でオートファジーフラックスを高感度に定量でき、ハイスループットフォーマットにも対応します。

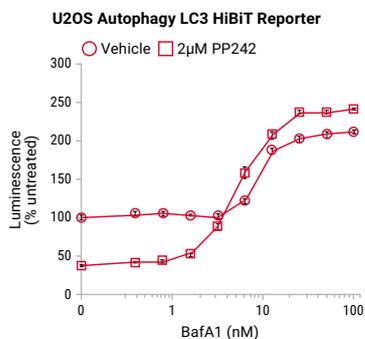
オートファジーレポーターシステムはオートファジーフラックスを定量するためにオートファジーマーカーとして広く知られている LC3 に 11 アミノ酸の発光タグ HiBiT を付加したレポーターを細胞に導入するため、試薬に含まれる相補的なポリペプチド LgBiT を添加することでその分解を検出することができます (シグナルの増加はオートファジーの阻害を示し、シグナルの低下はオートファジーの誘導を示す)。実験に合わせて構築済みの 2 種類のレポーター細胞株 (HEK293 または U2OS) またはご自身の細胞株で安定トランスフェクションするためのレポーターベクターからお選びいただけます。

- **定量性**：主観的なイメージングベースの分析に比べデータの解釈がシンプル。
- **簡便**：“添加 – 混和”してルミノメーターで測定するだけで、洗浄操作やイメージングやフローサイトメトリーなど煩雑なシステムは不要。ハイスループットスクリーニングも可能。プレートベースの測定で 384 ウェルプレートまで対応し、オートファジーモジュレーター候補物質を効率的にスクリーニング可能。
- **3D 細胞系に対応**：スフェロイドやその他の 3D 細胞モデルにおけるオートファジーの変化を解析可能。



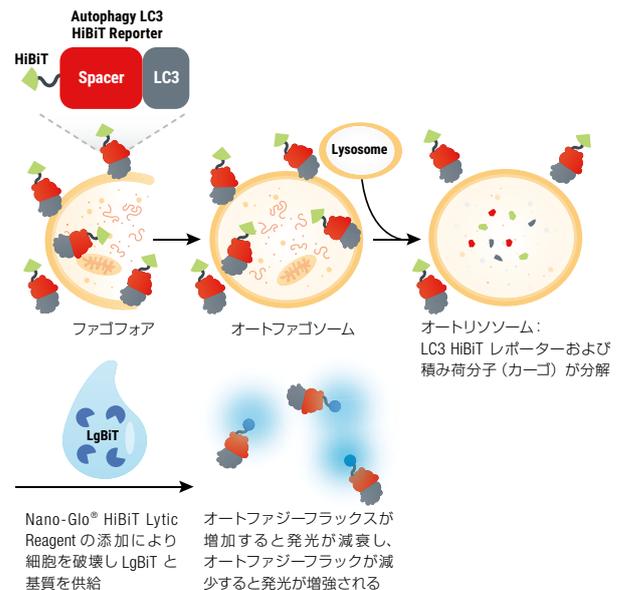
#### オートファジー誘導剤の評価

HEK293 Autophagy LC3 HiBiT Reporter Cells を白色 96 ウェルプレートに播種し (20,000 個 / ウェル)、オーバーナイトで細胞を付着させた。オートファジー誘導剤 PP242 の濃度を増加させて表示の時間トリプレートで処理を行った。Nano-Glo® HiBiT Lytic Reagent を添加後 10 分後に発光を測定した。平均シグナルは同時時間のピークルコントロールの値で補正した値。



#### オートファジー阻害剤の評価

U2OS Autophagy LC3 HiBiT Reporter Cells を白色 96 ウェルプレートに播種し (8,000 個 / ウェル)、オーバーナイトで細胞を付着させた。オートファジー阻害剤 Baf A1 の濃度を増加させて 2 µM PP242 の有無の 2 つの条件で 21 時間トリプレートで処理を行った。発光シグナルはそれぞれ未処理コントロールで補正した。PP242 による同時処理は、オートファジー阻害剤 Baf A1 のシグナルの増加幅を向上させるためにオートファジーを顕著に増加させ発光シグナルを低減させるために行った。



#### オートファジーレポーターシステムの原理

製品名	サイズ	カタログ番号
<b>オートファジーフラックスアッセイ (発光)</b>		
<b>ベクター + 検出試薬</b>		
Autophagy LC3 HiBiT Reporter Vector and Detection System	1 セット	GA2550
<b>細胞 + 検出試薬</b>		
HEK293 Autophagy LC3 HiBiT Reporter Cell Line and Detection System	1 セット	GA1040
U2OS Autophagy LC3 HiBiT Reporter Cell Line and Detection System	1 セット	GA1050
<b>検出試薬</b>		
Nano-Glo® HiBiT Lytic Detection System	10 ml	N3030

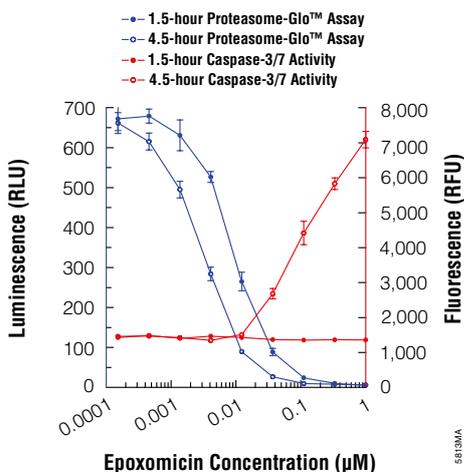
※ 製品購入における注意点: Autophagy LC3 HiBiT Reporter Assay の使用は非営利組織 (大学、公的研究機関など)、営利組織にかかわらず、ライセンスプログラムの内容 (www.promega.co.jp/license/) をご確認頂く必要があります。

# タンパク質分解：オートファジーフラックスとプロテアソーム (続き)

## Proteasome-Glo™ Cell Based Assay

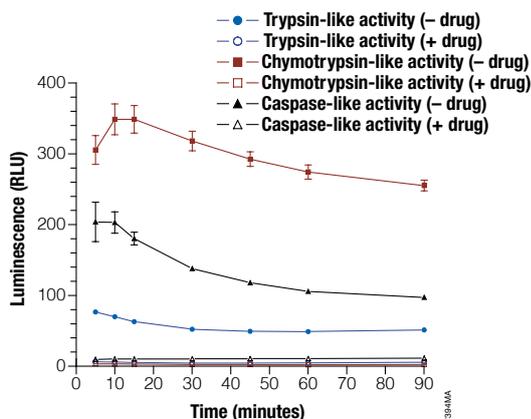
### 細胞内のプロテアソーム活性を高感度に測定

Proteasome-Glo™ Cell Based Assay は、培養細胞内に存在するプロテアソーム複合体のキモトリプシン様、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す。Proteasome-Glo™ Cell Based Assay では、特殊なバッファー (細胞透過性、プロテアソーム活性およびルシフェラーゼ活性に最適化) に溶解したプロテアソームに対する発光基質を使用します。“添加 - 混和 - 測定”の簡単なフォーマットで、Proteasome-Glo™ Cell Based Assay Reagent が添加されるとプロテアソームによる基質の切断が起こり、さらにルシフェラーゼ反応により迅速に発光シグナルが生じます。本システムでは各プロテアーゼの活性に特異的な発光基質、Suc-LLVY-aminoluciferin (キモトリプシン様活性)、Z-LRR-aminoluciferin (トリプシン様活性)、Z-nLPnLD-aminoluciferin (カスパーゼ様活性) を用います (※ Suc-LLVY, Z-LRR または Z-nLPnLD の配列を含む発光基質は 20S プロテアソームにも認識されます)。



### プロテアソームおよびカスパーゼ 3/7 活性検出のための連続マルチアッセイ

H929 細胞 (10,000 個 / ウェル) を 96 ウェルプレートに播種した。1 昼夜培養した後、エポキシマイシン (10 µl / ウェル) とともに 1.5 または 4.5 時間インキュベートした。Proteasome-Glo™ Cell Based Assay Reagent 添加 15 分後に発光を測定した。その後すぐに Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Reagent を 20 µl / ウェル添加した。アッセイプレートを 22°C、30 分間混和してカスパーゼ 3/7 による蛍光を検出した。



### エポキシマイシン処理細胞のプロテアソームシグナルカインेटクス

U266 細胞 (15,000 個 / ウェル) を 96 ウェルプレートに播種した。2 時間 37°C、5% CO<sub>2</sub> で平衡化した後にエポキシマイシン 0 または 8 µM で 2 時間処理した。Proteasome-Glo™ Cell-Based Reagent を添加、混和した後に発光を測定した。

- 簡便な " 添加 - 混和 - 測定 " だけのプロトコール
- 培養細胞より直接 キモトリプシン様、トリプシン様およびカスパーゼ様活性を測定
- 試薬添加 10 ~ 30 分以内に結果を取得

製品名	サイズ	カタログ番号
<b>プロテアソームアッセイ (発光)</b>		
Proteasome-Glo™ Chymotrypsin-Like Cell-Based Assay	10ml 5 × 10ml 2 × 50ml	G8660 G8661 G8662
Proteasome-Glo™ Trypsin-Like Cell-Based Assay	10ml 5 × 10ml	G8760 G8761
Proteasome-Glo™ Caspase-Like Cell-Based Assay	10ml 5 × 10ml	G8860 G8861
Proteasome-Glo™ 3-Substrate Cell-Based Assay System	10ml 50ml	G1180 G1200

※ 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。  
※ Proteasome-Glo™ 3-Substrate Cell-Based System は 3 種のプロテアソーム測定試薬のセットです。

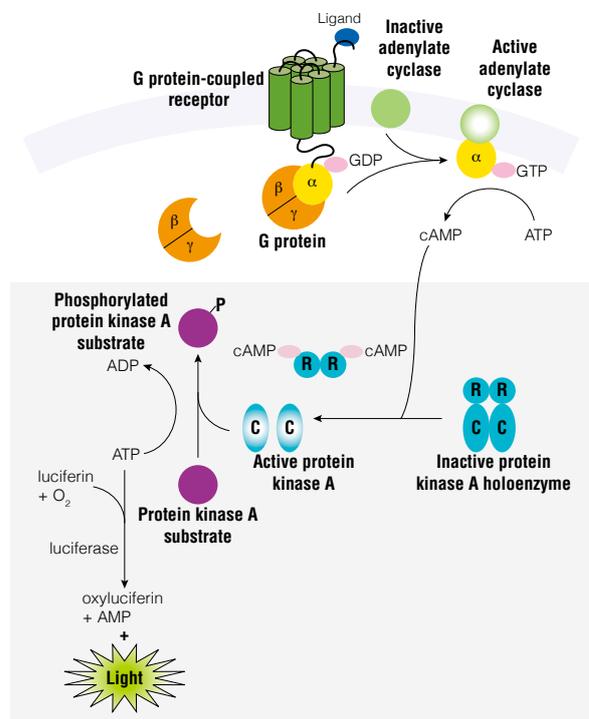
# 細胞内 cAMP を発光法により高感度に検出

## cAMP-Glo™ Assay

### 細胞溶解によるエンドポイントアッセイ

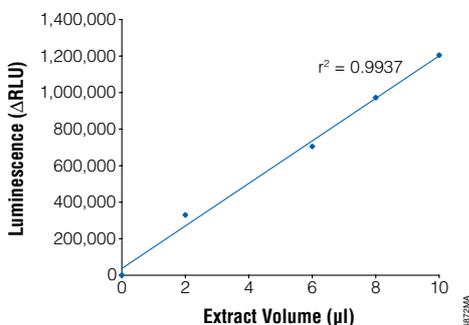
cAMP-Glo™ Assay および cAMP-Glo™ Max Assay は細胞内の cAMP を発光シグナルとして測定するホモジニアスなハイスルーブットアッセイシステムです (96、384 または 1536 ウェルプレートでアッセイ可能)。アデニル酸シクラーゼと連動する G タンパク質共役受容体 (GPCR) を変調させる化合物は、通常細胞内の cAMP レベルを変動させます。これらの製品は、GPCR に対するアゴニスト、アンタゴニストあるいはテスト化合物に応答する細胞内 cAMP レベルをモニタリングすることができます。本アッセイの原理は、cAMP がタンパク質キナーゼ A (PKA) 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づきます。実験では、cAMP レベルが変化する適切な時間をかけて細胞をテスト化合物で誘導します。誘導後に細胞を溶解し、プロテインキナーゼ A 供給します。次に残存する ATP を Kinase-Glo® Reagent で測定します。cAMP 標準曲線を用いることにより発光レベルから cAMP 濃度が決定されます。発光シグナルの半減期は 4 時間以上です。シグナルの半減期が長いので、ルミノメーターにインジェクターは不要で、マルチプレートのバッチモード処理を可能にします。cAMP-Glo™ Max Assay は cAMP-Glo™ Assay の改良型で、細胞溶解剤と cAMP 反応バッファーが cAMP-Glo™ ONE Buffer に統合されました。この新しいフォーマットによりプロトコルの効率化が図られ、アッセイ完了までの時間を短縮することができます。新しい ONE Buffer は 5 X 濃度で供給されるため培養ボリュームを柔軟に設定できるようになりました。

- **迅速で簡便:** シンプルなホモジニアスフォーマット (cAMP-Glo™ Max Assay では細胞溶解および cAMP 検出が 1 ステップに統合 [約 30 分でアッセイ完了])。
- **優れたシグナル / バックグラウンド比 (S/B 比):** 優れた S/B 比 (>200 [cAMP], >15 [細胞]) を示し、1536 ウェルプレート以上のフォーマットにも簡単に変更可能。
- **柔軟性:** ONE Buffer : 5X 濃度は細胞培養ボリュームの柔軟性を向上 (cAMP-Glo™ Max Assay)。
- **優れた発光技術を採用:** 定評のある Ultra-Glo™ Recombinant Luciferase を使用しており、蛍光化合物による干渉もありません。



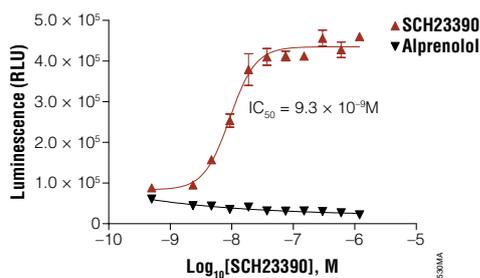
cAMP-Glo™ Assay の原理の概略図

細胞内 cAMP 濃度の変化により、ヘテロ四量体として存在する不活性状態の cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) が修飾され、調節サブユニット二量体から酵素活性を有する触媒サブユニット 2 個が遊離する。PKA の活性化は、キナーゼ反応における ATP 基質の減少によりモニターでき、残存する ATP はルシフェラーゼ反応により定量できる。



組織抽出液の cAMP-Glo™ Assay

ラット脳抽出液 2 ml/gm を、0.5 mM IBMX および 100 μM Ro20-1724 を含有する cAMP-Glo™ Lysis Buffer でホモジナイズし、70°C で 5 分間加熱した。0、2、4、6、8 および 10 μl のサンプルに等量の Krebs Ringer バッファーを添加した後、cAMP-Glo™ 反応バッファーを添加することにより試験を行った。反応液を室温で 20 分間インキュベーションした後、等量の Kinase-Glo® Reagent を添加した。10 分後の相対発光量を測定し、溶解バッファーのみの RLU 値から各サンプルの RLU 値を減じることで、ΔRLU を算出した。ΔRLU = RLU (0 μl) - RLU (サンプル)



**D1 受容体を発現する HEK293 細胞における SCH23390 の IC<sub>50</sub> 決定**  
細胞を Induction Buffer に懸濁し、384 ウェルプレートの各ウェルに 3000 個ずつ添加した。細胞は 100nM のアゴニスト、SKF38393 存在下で表示量のアンタゴニスト SCH23390 で処理した。ネガティブコントロール反応では SCH23390 の代わりにアルプレノロールを用いた。測定は cAMP-Glo™ Max Assay を使用した。

製品名	サイズ	カタログ番号
<b>cAMP アッセイ (発光・エンドポイント)</b>		
cAMP-Glo™ Assay	300 ウェル分	V1501
	3,000 ウェル分	V1502
	30,000 ウェル分	V1503
cAMP-Glo™ Max Assay	2 プレート分	V1681
	20 プレート分	V1682
	200 プレート分	V1683

※表示のサイズは 384 プレートの場合。  
※バルク注文については別途お問合わせください。

# 細胞内 cAMP を発光法により高感度に検出 (続き)

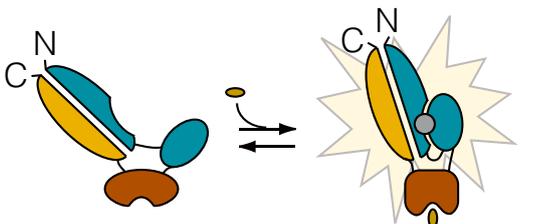
## GloSensor™ cAMP Assay リアルタイム

### cAMP センサーによるリアルタイムアッセイ

GloSensor™ cAMP Assay は、細胞内の cAMP レベルを測定する新しいアプローチを提供します。cAMP は Gas および Gai タンパク質を介した GPCR のシグナル伝達に関与する重要なセカンドメッセンジャーです。本製品は GloSensor™ 技術をベースにした新しいアッセイ法で、ホタルルシフェラーゼの内部に cAMP 結合タンパク質の一部を挿入するための遺伝子改変が施されたベクターを生細胞に導入します。発現したバイオセンサーに cAMP が結合すると、構造が変化して発光量が増加します。この生細胞アッセイは cAMP を通じたシグナル伝達のカイネティクスやモジュレーションの研究に最適です。

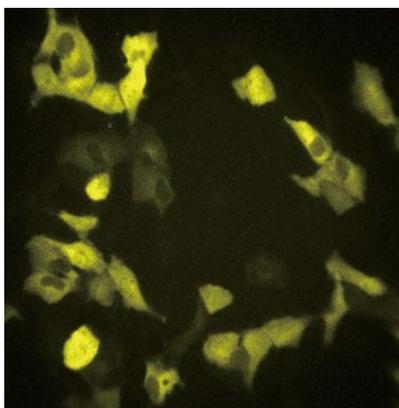
選択した細胞株で標的受容体および本バイオセンサーを一過性に発現させて GloSensor™ cAMP Assay を行います。また、バイオセンサーと受容体を安定に発現する細胞株を調製して実施することもできます。プロトコルはシンプルで、細胞を GloSensor™ cAMP Reagent で事前に約 2 時間平衡化します。その後、特異的なアゴニスト / アンタゴニストあるいは活性未知の化合物で処理し、10 ~ 30 分後に発光を測定します。それ以外に試薬の添加や、手作業は不要です。GloMax® などインジェクターが付属する標準的なルミノメーターで測定できます。GloSensor™ cAMP Reagent は、本アッセイでの使用に必要です (GloSensor™ Limited Use Label License に明示)。pGloSensor™ Plasmid は 2 種類のバイオセンサーバリエーションごとに 20F と 22F をご用意しています。多くの用途において pGloSensor™-22F を最初の選択肢として推奨します (詳細についてはプロトコル TM076 を参照下さい)。

- **シンプルなおアッセイ** : HTS や ultra HTS (例 : 3456- ウェル形式) に理想的な 0 ステップアッセイ。
- **リアルタイムの測定** : 処理後 15 分で cAMP レベルを検出。
- **より生体反応に近いデータ** : 非溶解性の生細胞アッセイによるカイネティックなデータ取得。



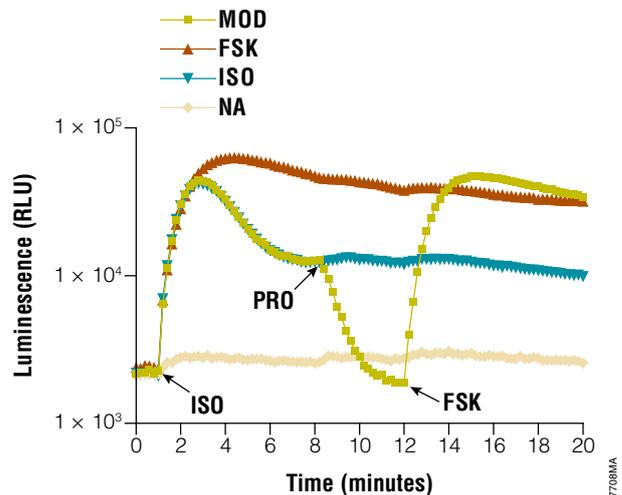
#### GloSensor™ cAMP Assay の発光原理

Allosteric (アロステリック型) 改変ルシフェラーゼ遺伝子: cAMP が結合するドメイン (RIIβB) の構造変化により発光シグナルが調節される。



#### HEK293 での cAMP モニタリング

GloSensor™ cAMP タンパク質を一過性に発現する HEK293 細胞のイメージング。イメージングは LV200 (オリンパス社) を用いた。



#### アロステリック cAMP バイオセンサー

生細胞 (37°C) におけるシグナルのカイネティクスと可逆性を示す。cAMP バイオセンサーを一過性に発現する HEK293 細胞を 10mM イソプロテレンール (ISO) または 10mM フォルスコリン (FSK) それぞれ単独で処理した。変調を加える細胞は、10 μM ISO, 10 μM プロプラノール (PRO) および 10 μM FSK で連続的に処理した。(n=3) Fan, F. et al. (2008) ACS Chem. Biol. 3, 346-51. より許可を得て転載した。

製品名	サイズ	カタログ番号
<b>cAMP アッセイ (発光・リアルタイム)</b>		
<b>ベクターおよび安定発現細胞株</b>		
pGloSensor™-20F cAMP Plasmid	20 μg	E1171
pGloSensor™-22F cAMP Plasmid	20 μg	E2301
<b>アッセイ試薬</b>		
GloSensor™ cAMP Reagent	1 vial (25mg*)	E1290
	1 vial (250mg*)	E1291

\* 25mg は 384 ウェル形式で 817 ウェル分。

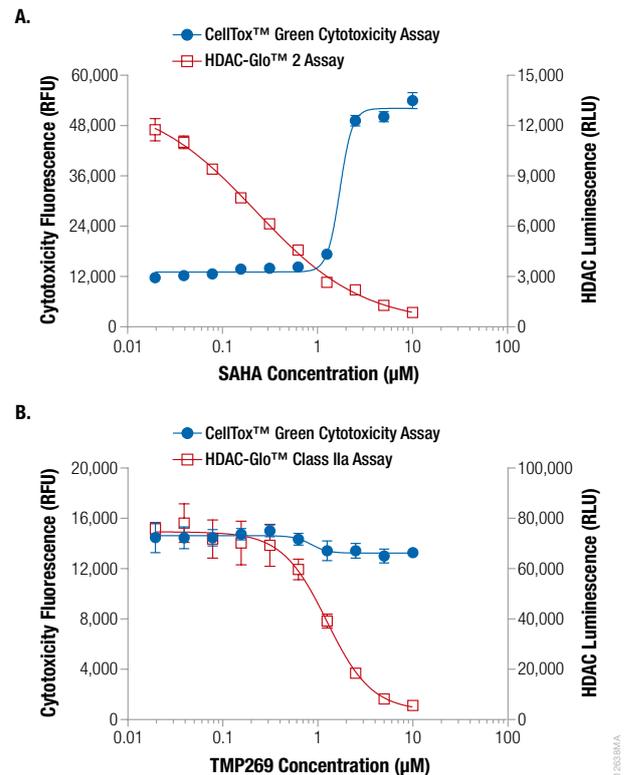
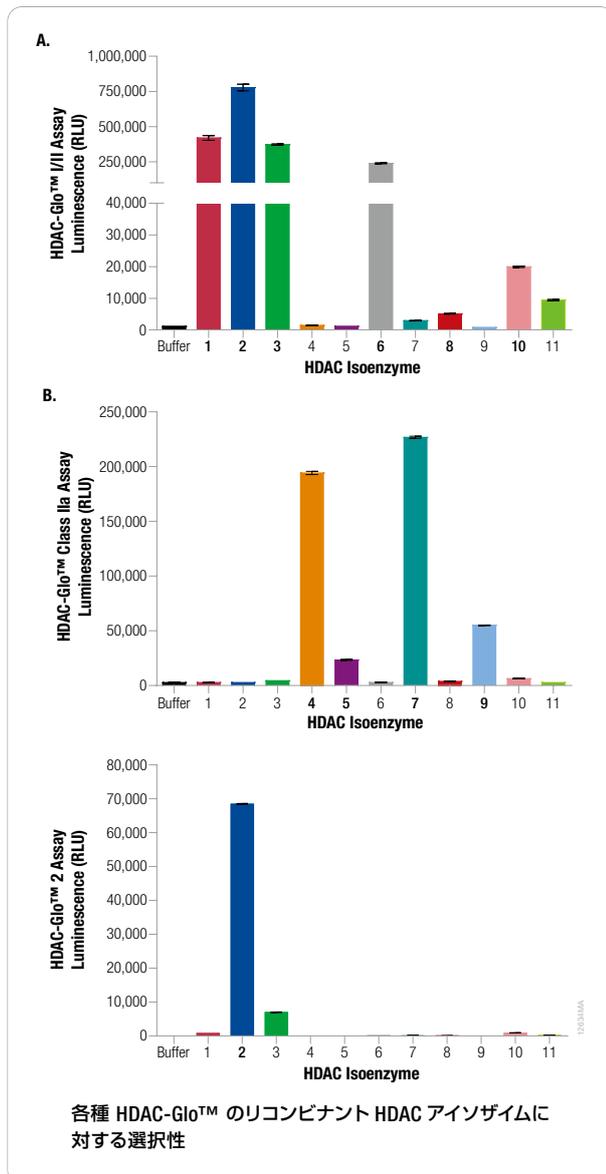
※製品購入における注意点: GloSensor™ cAMP Assay の使用は非営利組織 (大学、公的研究機関など)、営利組織にかかわらず、ライセンスプログラムの内容 (www.promea.co.jp/license/) をご確認ください。

## その他のバイオマーカー (エピジェネティクス、薬物代謝)

### HDAC-Glo™ Assay

#### 3種類の特異性基質が選べる発光 HDAC アッセイ

HDAC-Glo™ Assays 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。このアッセイでは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ます。このペプチドアミノルシフェリン基質の脱アセチル化は、Developer Reagent に含まれるアミノルシフェリン基質より脱アセチル化ペプチドを切除するプロテアーゼ消化反応と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連動により測定することができます。アッセイの反応は通常 15 ~ 45 分以内に完了し、サンプルを移し換えるような手間もありません。HDAC を介した発光シグナルは持続性 (半減期 3 時間以上) を持ち、マルチウェルプレートのバッチ処理も行えます。



#### HDAC-Glo™ と CellTox™ Green (細胞毒性試験) のマルチアッセイ

K562 細胞を CellTox™ Green Dye (細胞毒性試験) 存在下で SAHA (選択的クラス I/IIb HDAC 阻害剤) または TMP269 (選択的クラス IIa HDAC 阻害剤) に 72 時間暴露した。細胞毒性を蛍光測定した後、HDAC-Glo™ 2 Assay または HDAC-Glo™ Class IIa Assay で発光測定した。

製品名	サイズ	カタログ番号
<b>HDAC アッセイ (発光)</b>		
	10ml	G6420
HDAC-Glo™ I/II Assay	5 × 10ml	G6421
	100ml	G6422
HDAC-Glo™ Class IIa Assay	10ml	G9560
HDAC-Glo™ 2 Assay	10ml	G9590

※ 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。

# その他のバイオマーカー (エピジェネティクス、薬物代謝) (続き)

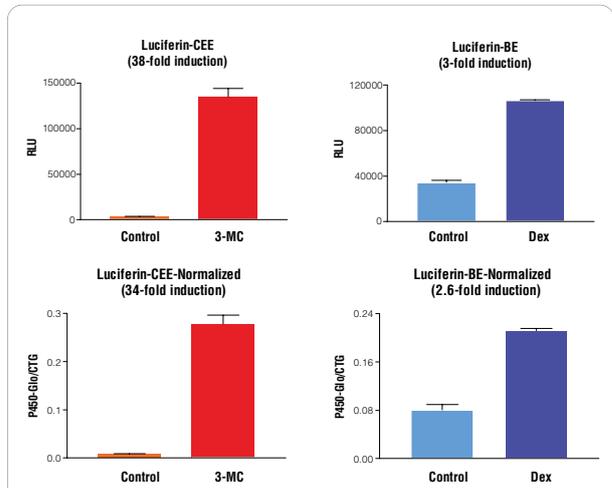
## P450-Glo™ Assay 3D

### 細胞内の P450 活性を簡便に測定

P450-Glo™ (Cell Based) Assay は発光法を利用してシクロクロム P450 活性を測定するためのシステムです。この発光法によるアッセイは、非常に優れた感度を有し、低いバックグラウンド、広いダイナミックレンジを示します。P450-Glo™ Assay では、ルシフェリン誘導体である P450 発光基質を利用し、P450 活性により変換されたルシフェリンをルシフェラーゼ発光量として検出することができます。P450-Glo™ Assay で生成する“グロータイプ”の発光シグナルは、耐熱性ルシフェラーゼと特殊なバッファーシステムを組み合わせることにより実現しました。

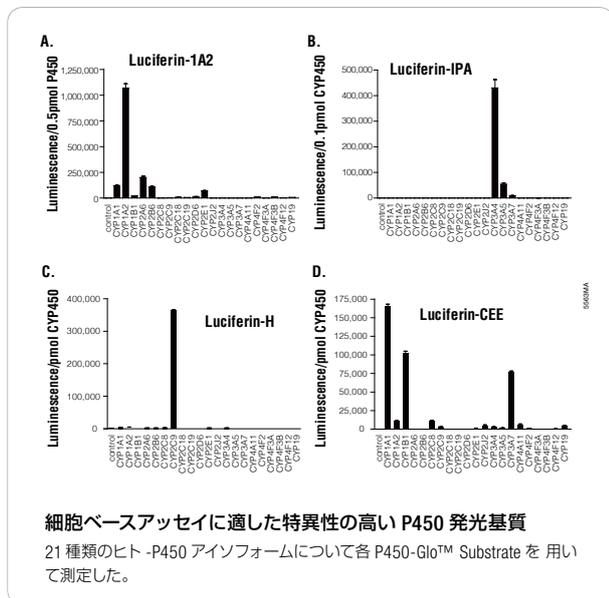
P450 発光基質および反応産物(ルシフェリン) は細胞透過性であるため細胞ベースのアッセイが可能です。発光性基質と培養細胞をインキュベートすると細胞内の CYP 酵素により変換されたルシフェリンは、非溶解アッセイ(細胞上澄を移してアッセイ)あるいは溶解アッセイ(細胞を含むウェルでアッセイ)で測定されます。非溶解アッセイの場合、P450 活性測定後に残る細胞を利用して他の細胞ベースアッセイを行うことができます(細胞生存性試験: CellTiter-Glo® など)。P450-Glo™ Assay を用いた細胞ベースのアプリケーションとして、基底 CYP 活性の測定、テスト化合物による活性誘導、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

- **迅速**: 煩雑で時間のかかる LC/MS や薄層クロマトグラフィーに比べ飛躍的に分析時間を短縮化。
- **シンプル**: 簡単なプロトコルなのでマルチウェルプレートを用いたハイスループットスクリーニングに対応。
- **蛍光による干渉なし**: 発光法なので、蛍光法で問題となる分析対象や NADPH, CYP 基質の励起波長 / 蛍光波長の干渉が問題になりません。
- **低い偽陽性**: 新規な安定型ホタルルシフェラーゼ (Ultra-Glo™ Luciferase)、バッファー組成によりルシフェラーゼ阻害による偽陽性を低減。



#### 生細胞数で補正した P450 アッセイデータ

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



#### 細胞ベースアッセイに適した特異性の高い P450 発光基質

21 種類のヒト-P450 アイソフォームについて各 P450-Glo™ Substrate を用いて測定した。

製品名	サイズ	カタログ番号
<b>P450 アッセイ (発光)</b>		
P450-Glo™ CYP1A2 Induction/Inhibition Assay	10ml	V8421
	50ml	V8422
P450-Glo™ CYP3A4 Assay with Luciferin-IPA	10ml	V9001
	50ml	V9002
P450-Glo™ CYP1A1 Assay (Luciferin-CEE)	10ml	V8751
	50ml	V8752
P450-Glo™ CYP2C9 Assay (Luciferin-H)	10ml	V8791
	50ml	V8792

※ 96 ウェルプレートの場合 10ml は 200 ウェル分、50ml は 1000 ウェル分に相当 (1 ウェルあたり 50µl 使用)。384 ウェルプレートの場合 10ml は 400 ウェル分、50ml は 2000 ウェル分に相当 (1 ウェルあたり 25µl 使用)。

# ルシフェラーゼ発光技術

ルシフェラーゼ酵素、基質および酸素（ホタルルシフェラーゼは ATP も）により発光シグナル（光子）を生じる発光反応はその希少性から殆どの生物においてバックグラウンドが実質的に無く、さらにエネルギー変換効率の高さや光源を不要とする特性により長く生物学実験で利用されています。しかし、急激に消光する特性やルシフェラーゼタンパク質の不安定性（易熱性）などのネイティブタンパク質の本来の性質により、アプリケーションは限られていました。プロメガは発光時間の延長や反応系の安定化を図ることにより、これらの問題を解決することで、より使いやすく、幅広い用途に使えるルシフェラーゼ試薬を開発してきました。

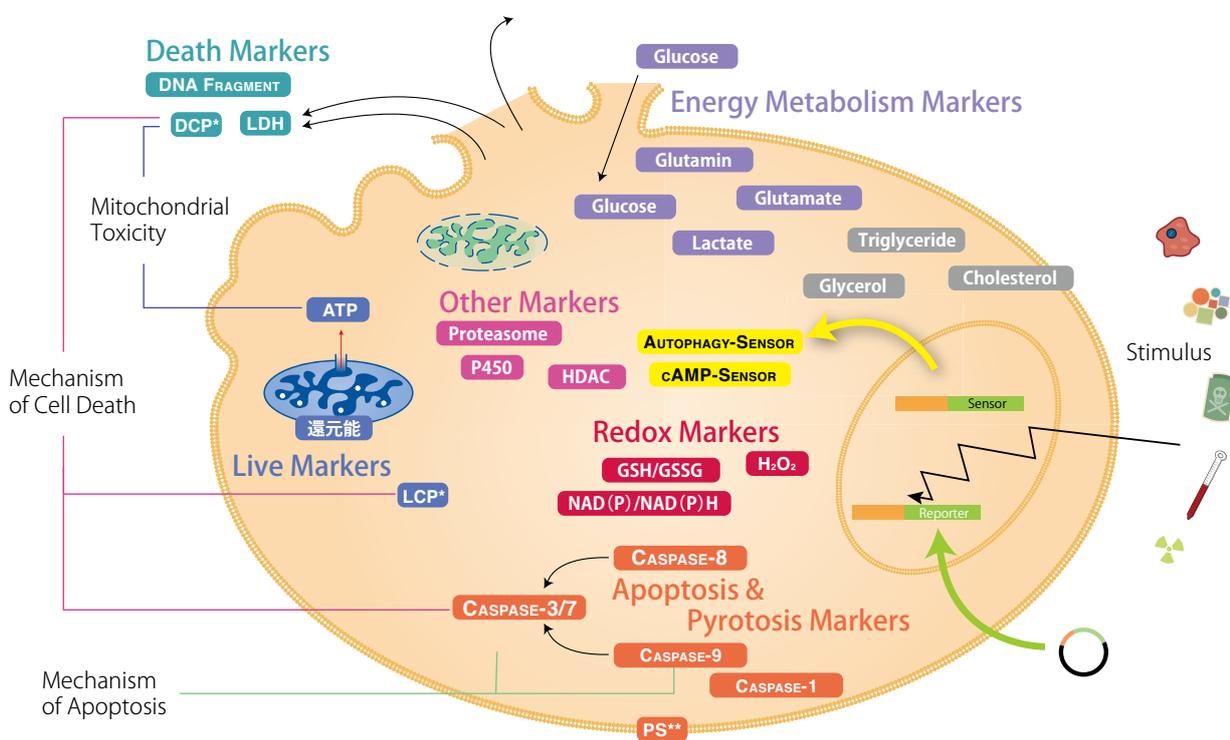
## Ultra-Glo™ ルシフェラーゼ

安定性の高い改変型ホタルルシフェラーゼで、プロメガの ATP およびルシフェリン検出試薬（発光アッセイ試薬）に含まれています。様々な試薬成分存在下でも活性が保持されるため、様々なアッセイ試薬の構成成分として利用されています。またネイティブのルシフェラーゼに比べ偽陽性が低く抑えられているため、ハイスループットスクリーニングにも最適です。

## NanoLuc® ルシフェラーゼ

深海エビ（トゲオキヒオドシエビ [*Oplophorus gracilirostris*]）由来の新しいルシフェラーゼで、発光レポーターとして最適なパフォーマンスを発揮するために改変された分子量の小さな発光酵素（19 kDa）です。このルシフェラーゼはホタルやウミシイタケのものより約 150 倍明るく、高レベルの発光を長時間維持するための新規な基質 furimazine を用いて測定します。発光反応は ATP 非依存性で、最大の感度を得るためにバックグラウンド発光が抑えられるようにデザインされています。furimazine を改変した MT Cell Viability Substrate は細胞透過性の前駆体基質で、生細胞の還元能により NanoLuc® の基質に変換され、発光反応に利用されます。この基質は RealTime-Glo™ に含まれており、経時的な細胞生存性試験を可能にします。また、この NanoLuc® を 2 つに分断した SmBiT および LgBiT 断片にアネキシン V を融合させたタンパク質を利用した発光アッセイ法によりリアルタイムにアポトーシスを観察することができるようになりました。

## プロメガのアッセイ試薬で測定可能な各種バイオマーカー



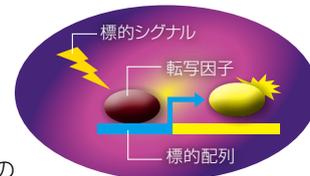
\* LCP: Live Cell Protease, DCP: Dead Cell Protease

\*\*PS : Phosphatidylserine

# レポーターアッセイ：プラスミドセンサーを導入した細胞アッセイ

## 外来性の DNA を導入し、細胞内の様々な情報をレポートするバイオセンサー

生体機能を反映すると同時に実験のスループットを満たす培養細胞は、これまでの生物学実験に必須の実験サンプルであり、生きた細胞の変化や応答性を内在性の様々なマーカーを指標として測定する高感度な測定法が開発されました。多くの細胞内イベントは酵素によるシグナル伝達や代謝経路で構成されており、これらのマーカーとしての酵素や代謝物を測定することで細胞内の応答を測定することができます。しかし、酵素活性を持たない場合、結合活性 [相互作用] (タンパク質 : DNA、タンパク質 : タンパク質) を測定することは有用です。細胞内での分子間相互作用は外来遺伝子ベクターを導入することで容易に測定することができます。これは細胞内の重要な情報をキャッチする重要なバイオセンサーと考えることができます。



## 転写活性レポーター (ジェネティックレポーター)

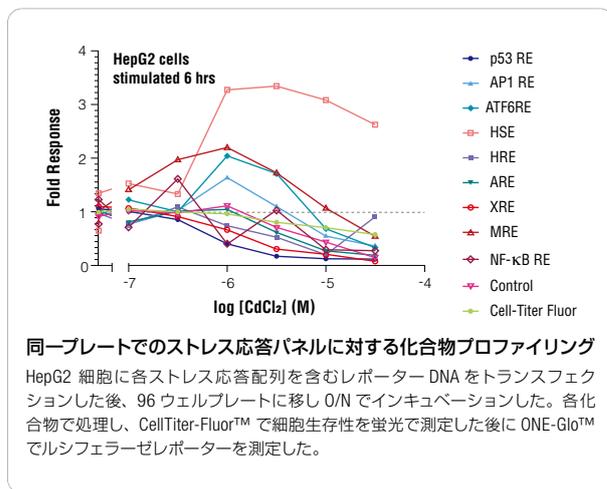
### 転写応答をレポートするジェネティックレポーターの応用

定量に適した酵素を利用したレポーターアッセイは遺伝子発現に必要なシスエレメント (DNA 配列) の解析に長く利用され、様々なシグナル伝達経路から転写因子に対応したプロモーター、応答配列が明らかとなりました。これらシグナル応答に対応する応答配列を“受信機”、レポーター酵素を“定量可能なシグナル”として利用することにより、低分子化合物のスクリーニング、抗体医薬の評価、毒性物質の感受性試験などに利用されるバイオセンサーとして応用されています。近年普及してきたゲノム編集技術や高輝度レポーター酵素 (NanoLuc® など) を組み合わせることでより様々な分野での応用が期待されます。

### 転写活性 / シグナル伝達

#### 特定のシグナルの ON と OFF をハイスループットで解析

分子生物学的手法により様々なタンパク質発現にかかわる転写調節配列が明らかになり、レポーターアッセイは細胞内のシグナル伝達スイッチ (転写量) を検出する有効なツールとして基礎研究や創薬研究に利用されています。細胞は化学物質による毒性のほか、紫外線、放射線、温度、物理的刺激など様々なストレスに絶えずさらされています。これらのストレスには細胞内のストレス応答機構が反応することが分かっています。レポーターアッセイは、このようなストレス応答機構を含め、細胞の広範なシグナル経路の解析ができます。プロメガでは種々の細胞ストレスに対する応答エレメントを搭載した、レポーターベクターを幅広く揃えています。これらのベクターを用いたレポーターアッセイにより、細胞ストレスのシグナル伝達経路の特定、各種細胞のストレス耐性の検討、ストレス化合物の毒性評価などの解析が可能です。

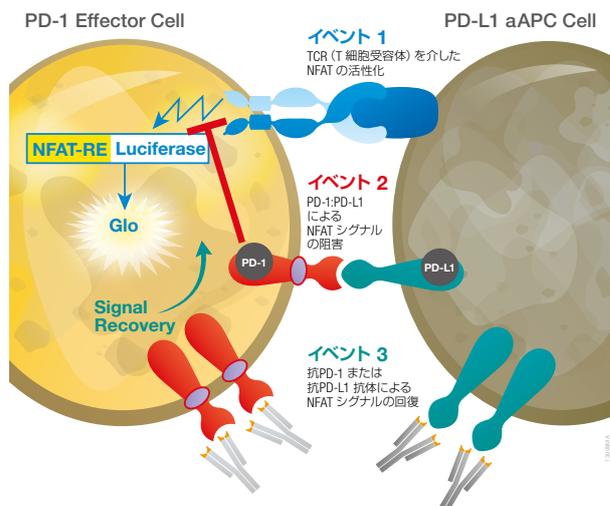


### バイオリジクスのためのバイオアッセイ

#### 抗体医薬の開発・品質管理に最適 [応答配列: NFAT, IL-2 など]

NFAT 応答や IL-2 プロモーターは免疫細胞などが活性化すると応答することが知られており、ルシフェラーゼを組み込んだ細胞はバイオリジクス (抗体医薬など) を評価するバイオセンサーとして利用することができます。プロメガではルシフェラーゼレポーターを組み込んだ細胞を含む ADCC (抗体依存性細胞傷害)、ADCP (抗体依存性細胞貪食)、PD-1/PD-L1 遮断、T 細胞活性化に関する各種バイオアッセイをそろえています。

### PD-1/ PD-L1 Blockade Bioassay の測定原理



### 感受性試験

#### 化粧品、医薬部外品の安全性評価、薬物代謝試験や環境ホルモン検出など [応答配列: ARE, XRE など]

応答配列とレポーターを組み合わせたバイオセンサーは化合物やホルモンなどの生理活性物質を検知することができます。KeratinoSens™ (Givaudan 社が開発) は皮膚感受性を調べるための *in vitro* 試験法として化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用されています。この手法の原理は ARE 応答配列を利用したレポーターアッセイです。従来はマウス等の動物を用いて皮膚感受性試験が行われていましたが、近年、動物実験代替法としてこのような *in vitro* の試験手法が一般化されつつあります。

## タンパク質標識レポーター (プロテインレポーター)

### 標的タンパク質と融合させたタンパク質機能の解析、イメージングへの応用

これまで、標的タンパク質の局在性観察や単離・精製を容易にするために検出に適したタンパク質 (例: 蛍光タンパク質) や特定の分子と親和性を有するタンパク質 (例: His タグ) を融合させた標的タンパク質を発現させる手法が利用されてきました。また、酵素などに変異を加えたタンパク質センサーなども開発されています。プロメガでは新しいレポーター分子 NanoLuc® と HaloTag® 並びにホタルルシフェラーゼをプロテインレポーターとして様々なバイオセンサーを開発しています。

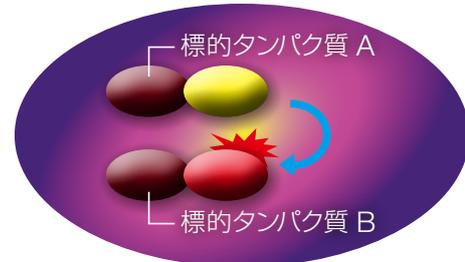
•NanoLuc®: 分子量 19kDa の小さな発光酵素で、従来のルシフェラーゼの 100 倍以上の輝度を有する最新のルシフェラーゼ

•HaloTag®: 分子量 33kDa のタンパク質で試薬として加える低分子の蛍光リガンドやビオチンリガンドと特異的に共有結合するため、細胞内イメージングやタンパク質精製が可能

### タンパク質間相互作用

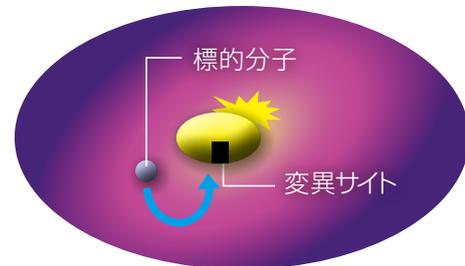
#### NanoBRET™

NanoLuc® 融合タンパク質 (X) と HaloTag® 融合タンパク質 (Y) を細胞内で発現させ、タンパク質間の相互作用を BRET (生物発光共鳴エネルギー転移) で検出するシステム。NanoLuc® による強力な発光と HaloTag® を標識するための HaloTag® 618 Ligand の蛍光特性によりこれまでにはない BRET 解析が可能です。



#### NanoBiT™

NanoLuc® を低分子の SmBiT (11 アミノ酸) と LgBiT (17.6kDa) に分割した酵素断片をそれぞれタンパク質 (X) またはタンパク質 (Y) との融合タンパク質として発現させ、細胞内で標的タンパク質間の相互作用を検出する発光アッセイ法。SmBiT が非常に小さいため標的タンパク質の機能を損わず、発光による高感度測定が可能です。



### 酵素改変センサー

#### GloSensor™

発光酵素自体を改変することで様々なバイオセンサーを設計することができます。ホタルルシフェラーゼの内部に cAMP 結合タンパク質の一部を挿入するための遺伝子改変を行った GloSensor™ cAMP Assay は細胞内の cAMP をリアルタイムに検出することができます。

### タンパク質安定性試験 (タンパク質分解)

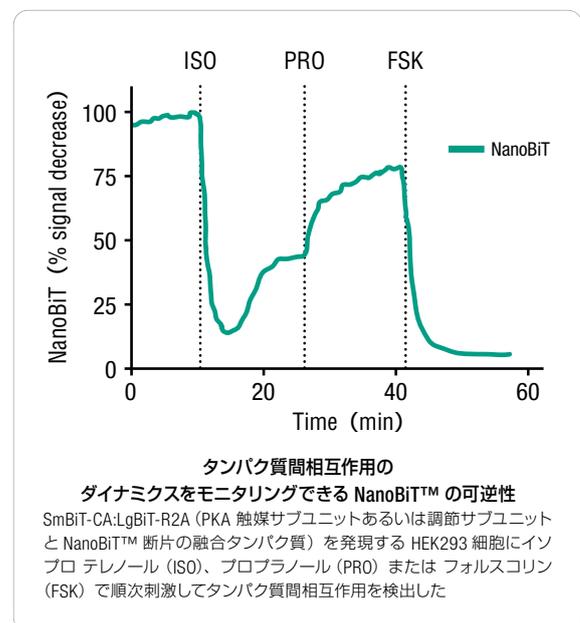
#### NanoLuc™ または HaloTag® 融合タンパク質

細胞内でのタンパク質のターンオーバーのスピードはそれぞれ異なり、その安定性を定量化することでより上流のシグナルを捕えることができます。NanoLuc® や HaloTag® との融合タンパク質は簡便に作成できるタンパク質安定性センサーとして機能します。

### 標的タンパク質の検出

#### HiBiT

標的タンパク質の遺伝子に HiBiT 配列 (11 アミノ酸) を導入し、LgBiT を含む試薬を添加することで標的タンパク質を高感度に検出することができます (HiBiT と LgBiT タンパク質のペアは SmBiT と LgBiT のペアとは異なり高い親和性を有する)。HiBiT はサイズが非常に小さいのでゲノム編集による内在性タンパク質の検出やウイルスゲノムへの導入に最適です。現在、ライセート中のタンパク質の迅速な定量法や膜に転写したタンパク質の高感度測定などのアプリケーションが考えられています。詳細については弊社までお問合せください。



レポーターアッセイの詳細について以下の  
“発光レポーターガイド”をご覧ください。  
[www.promega.co.jp/tech/reference](http://www.promega.co.jp/tech/reference)



# マルチプレートリーダー

## GloMax

ルミノメーターは生物発光を高感度に測定する装置で、ルシフェラーゼレポーターアッセイの普及により一般的になり、現在では細胞ベースの様々なアッセイや生化学的測定にも使用されています。プロメガのルミノメーターは、数多くの発光アッセイ試薬を開発しアッセイケミストリーを熟知した技術者のアイデアを反映させた、高感度で使いやすい測定装置です。



GloMax® Discover/Explorer

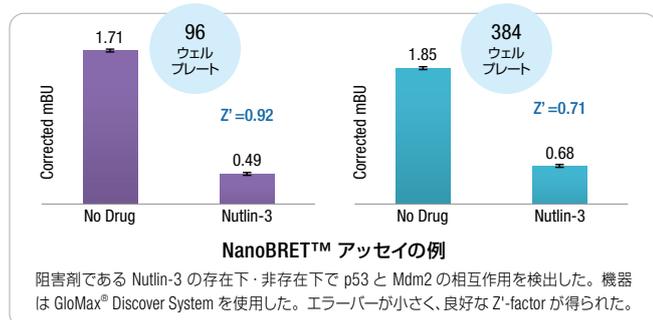
GloMax® Navigator

### GloMax® System

GloMax® Discover System はプロメガのアッセイシステムに関する英知を結集してデザインした Ready-to-Use の多機能性マルチモードリーダー（発光、蛍光、吸光 [UV / 可視光]、BRET、FRET）で、カイネティクス測定にも対応します。プリインストールされたプロメガ試薬のアッセイプロトコルで直ぐに実験を開始することができ、ネットワークへのアクセスによりデータを望みのドライブに転送することができます。フィルターパドルとフィルター自動切り替え機能によりマルチプレックスアッセイやカイネティクス実験にも対応します。プレートマスキングシステム (96 / 384 スイッチング) によりウェル間のクロストークを極限まで抑えた高感度測定が可能となり、ワイドなダイナミックレンジが得られます。多機能な Discover (発光、蛍光、吸光や BRET / FRET 測定機能) から発光測定専用機 Navigator まで用途に合わせてお選びいただけます。

#### 特長 (GloMax® Discover)

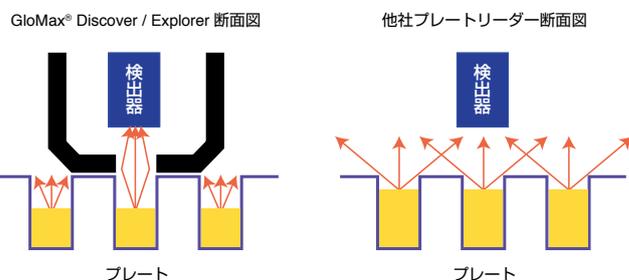
- 発光、蛍光、吸光 [UV / 可視光] 測定および BRET、FRET 対応
- 9 桁以上のダイナミックレンジ (発光測定)
- 6 ~ 384 ウェルプレートおよび自動分注口ポットによる HTS にも対応 (ハイスピード測定: 96 ウェル [1 分間]、384 ウェル [3 分間])
- 攪拌機能 / 温度管理機能
- 付属のタブレット PC によるタッチスクリーン操作、LAN 接続



#### GloMax® Discover / Explorer / Navigator System の装備比較

Model	Lum	Fluor.	Vis Abs	UV-Vis Abs	BRET/FRET
GloMax® Discover GM3000	✓	✓		✓	✓
GloMax® Explorer GM3500	✓	✓	✓		
GloMax® Explorer GM3510	✓	✓			
GloMax® Navigator GM2000	✓				

#### クロストークを最小限に抑える検出機構



製品名	サイズ	カタログ番号
GloMax® Discover System (発光 / 蛍光 / 紫外可視吸光 / BRET / FRET)	1 台	GM3000
GloMax® Explorer System, Fully Loaded Model (発光 / 蛍光 / 可視吸光)	1 台	GM3500
GloMax® Explorer System, Luminescence and Fluorescence (発光 / 蛍光)	1 台	GM3510
GloMax® Navigator System (発光)	1 台	GM2000



ルミノメーターをお貸しいたします!

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

日本語 Web site : [www.promega.co.jp](http://www.promega.co.jp)

テクニカルサービス • Tel. 03-3669-7980 • E-Mail : [prometec@jp.promega.com](mailto:prometec@jp.promega.com)

## プロメガ株式会社

本社 〒103-0001  
東京都中央区日本橋小伝馬町1-5 PMO日本橋江戸通ビル 7F  
Tel. 03-3669-7981

大阪事務所 〒541-0051  
大阪市中央区備後町4-1-3 御堂筋三井ビルディング  
Tel. 06-6202-4581

※製品の仕様、価格については 2020 年 9 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