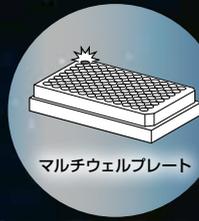
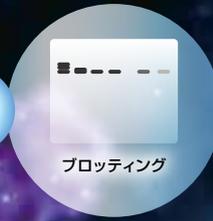


抗体の
いらない



or




Promega

発現タンパク質の高感度発光検出法

Nano-Glo[®] HiBiT Protein Detection System

11 アミノ酸が効く！
極小の発光タグ HiBiT

付録つき

- ★ CRISPR / Cas9 ゲノム編集による HiBiT ノックインプロトコル
- ★ HiBiT クイックスタートガイド

プロメガ株式会社

発現タンパク質検出法に革命！

～極小の発光タグでありのままのタンパク質機能解析を～

近年、生きた細胞を用いて生理現象を“ありのまま”検出したいというニーズが高まっており、特にライセルでの実験系、ゲノム編集によるタンパク質の機能解析など、より内在的な解析法が求められています。プロメガは抗体を用いることなくこれまで実現が難しかった“生きたまま”の細胞でもタンパク質定量が可能な画期的な発光タグシステムを開発しました。HiBiT system は 11 アミノ酸のペプチドタグと、それに結合する相補的な NanoLuc[®] ルシフェラーゼ断片と基質を用いた発光法によって目的タンパク質を検出する技術です。すでに実用化されているタンパク質検出タグとして、アフィニティータグ (His、c-Myc、FLAG 等) や GFP 等の蛍光タンパク質が知られていますが、簡便性、親和性、アプリケーション、ランニングコストの面で長所と短所があるため、実験により使い分ける必要がありました。HiBiT system はタンパク質定量に関して、これらいずれの点においても高い性能を持ち、これまで難しいとされた様々な実験系を実現できる世界初の新規発光タグシステムです。

- 生細胞で“生きたまま”タンパク質定量が可能 (生細胞アッセイ)
- 小さなタグ (11 アミノ酸) : ウィルスゲノム挿入やゲノム編集への応用
- 抗体不要で迅速・簡便に溶液中、プロットングメンブレン上のタンパク質定量が可能 (細胞溶解アッセイ)

HiBiT 開発までの道のり

2012 年、プロメガはより明るく小さい新規のルシフェラーゼとして NanoLuc[®] ルシフェラーゼを開発しました。これにより従来のレポーター遺伝子アッセイの高感度化だけでなく、タンパク質レポーターとして新たなアプリケーションにも展開できるようになりました。

2015 年、大小 2 つの NanoLuc[®] 断片の相補性を利用した NanoBiT[®] System をタンパク質間相互作用の解析ツールとして開発しました。この技術により、これまで難しかった生細胞でのタンパク質間相互作用を高感度に定量できるようになりました。開発の過程で大きな断片である Large BiT (LgBiT) [約 18kDa] と相補性を持つ小さなペプチド断片 (11 アミノ酸) をスクリーニングし、最も親和性の低い断片 (Kd=190 μM) を Small BiT (SmBiT) と採用しました。さらに、最も高い親和性を有するペプチド (Kd=700 pM) を HiBiT と名づけ、発現タンパク質を高感度に検出するための発光タグとして様々なアプリケーションについて検討を行いました。

アルファテスターのご協力

HiBiT は不可能を可能にする新しいタンパク質検出方法として広範な用途への利用が考えられ、多くの方にテスターとしてご意見を賜りました。日本国内でも 30 名以上のテスターの方に種々のテスト実験をして頂き、頂いたフィードバックをもとに製品開発の参考にさせて頂きました。そのうちの 3 名のテスター参加者への導入エピソードをご紹介します。

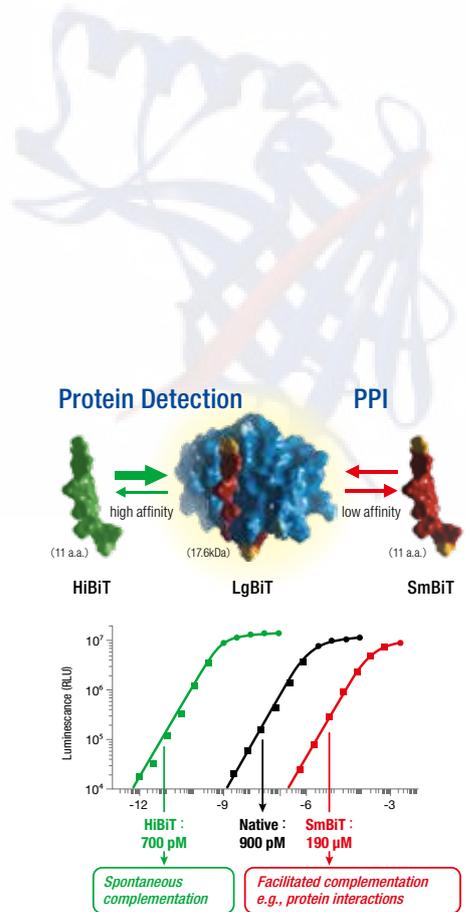


図 1. スクリーニングより得られたペプチドと LgBiT との親和性

ハイスループットかつ“生きたまま”の分泌タンパク質定量 (HiBiT Extracellular Detection)

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 システム発生・再生医学研究分野 松島隆英 先生

松島先生はこれまで分泌タンパク質の細胞外での定量に様々な手法を検討されてきました。ELISA assay や質量分析の手法では相性のよい抗体が必要、また HTS に向かないなどの問題がありました。そこで、NanoLuc[®] 融合タンパク質を用いた実験系をご紹介します。特に HTS での簡便な実験系ができるようになりました。さらに今回 HiBiT をご紹介し、より内在的な解析のための CRISPR / Cas9 system によるゲノム編集が可能になり、培養細胞だけでなく最終的には究極的な“生きたまま”の実験系であるマウス in vivo 解析へと展開して頂いています。



CRISPR
Cas9

レポーターのウィルスゲノムへの導入 (HiBiT Intracellular Detection)

大阪大学微生物病研究所 分子ウイルス分野 福原崇介 先生

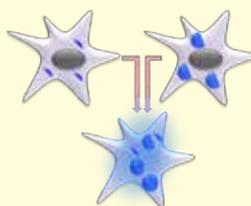
福原先生はハイスループットなスクリーニング系構築のための、様々なウイルスを利用した変異ウイルスレポーター作製を研究しておられました。問題点として、小型ウイルスでは Firefly などの大きなルシフェラーゼの挿入は困難であるという点がありました。そんな中、小型のレポーターとして NanoLuc[®] をご使用頂き、C 型肝炎ウイルスなどの小型ウイルスへの導入が可能であることを検証頂いておりました。さらに今回、ペプチドレベルまで最小化した HiBiT をご紹介し、これまでレポーターの挿入が不可能であった多くのウイルスにレポーターの導入が可能になるとの声を頂き、検証して頂いております。



筋芽細胞の細胞融合の定量化 (HiBiT Intracellular Detection)

名古屋大学 医学部保健学科 理学療法学専攻 亀高 諭 先生

亀高先生は骨格筋が再生する際に見られる筋芽細胞の融合現象の定量化の手法を探しておられました。細胞融合のモニタリングにはこれまで GFP や RFP などの蛍光タンパク質が一般的でした。2 つの細胞にそれぞれの蛍光タンパク質を発現させ、細胞融合によりそれらが merge し、ダブルポジティブな細胞をイメージングにより細胞融合を評価する系です。ただしこの手法は基本的にはイメージングでの定量であるため、定量性やスループットに限界がありました。今回 HiBiT をご紹介したところ、細胞融合により発光定量ができる点に注目頂き、これまで実現できなかった細胞融合の定量化手法としてご検討頂くことになりました。



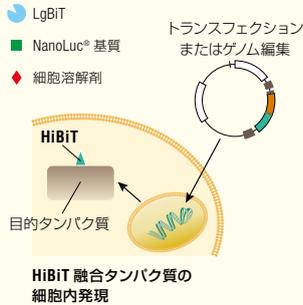
HiBiTの特徴とアプリケーション

HiBiT システムのベースとなる HiBiT は大きさがわずかに 11 アミノ酸であり、高い親和性 (Kd = 約 1 nM) で LgBiT と結合して NanoLuc® を再構成し、強い発光を生じます。この非常に明るい光により過剰発現させることなく内在レベルで発現する目的タンパク質の定量化が可能であり、CRISPR 等のゲノム編集技術と組み合わせることで内在ローカスにこの HiBiT タグを埋め込むことで実質的にあらゆるタンパク質の発現をモニタリングすることができます。また、SDS-PAGE で分離した HiBiT タグ付きタンパク質をプロットングし、LgBiT を含む検出試薬を添加するだけでフェムトグラムレベルの感度でタンパク質を検出することができます。さらに、細胞を溶解することなく HiBiT タグタンパク質の細胞表面発現、膜受容体の内在化、また分泌タンパク質を数分で測定することもできます。シンプルな 1 回試薬添加のアッセイプロトコールなのでハイスループットアプリケーションにも最適です。

タグの導入

キーポイント

- ✓ **明るい** ⇒ 高輝度 NanoLuc® の発光
- ✓ **シンプル** ⇒ 抗体不要、標準的なルミノメーター
- ✓ **小さなタグ (11 アミノ酸)** ⇒ 対象タンパク質への影響が最小限、ゲノム編集に最適



各 HiBiT ベクターには N 末付加、C 末付加および分泌型 (sec) を揃えています。

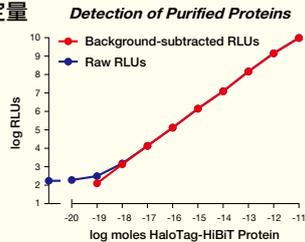
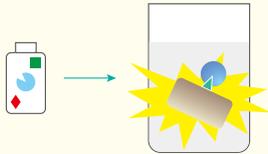
製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
HiBiT ベクター (MCS クローニング)			
pBiT3.1-N [CMV/HiBiT/Blast] Vector	20 µg	N2361	73,000
pBiT3.1-C [CMV/HiBiT/Blast] Vector	20 µg	N2371	73,000
pBiT3.1-secN [CMV/HiBiT/Blast] Vector	20 µg	N2381	73,000
HiBiT ベクター (Flexi® クローニング)			
pFC37K HiBiT CMV-neo Flexi® Vector	20 µg	N2391	73,000
pFN38K HiBiT CMV-neo Flexi® Vector	20 µg	N2401	73,000
pFN39K secHiBiT CMV-neo Flexi® Vector	20 µg	N2411	73,000
コントロールタンパク質			
HiBiT Control protein	100 µl	N3010	32,000

※ HiBiT タグの導入方法については次のページをご覧ください。

1

細胞ライセートのタンパク質定量

HiBiT Lytic Detection



目的タンパク質に HiBiT を付加し、細胞内で発現させ、細胞溶解成分を含む試薬 (LgBiT、NanoLuc® 基質を供給) を添加して発光測定する。

- 試薬を 1 回添加するだけのシンプルな手順
- 10 分以内に実験完了
- 7 桁以上の広いダイナミックレンジ (30kDa タンパク質で 10fg-100ng)

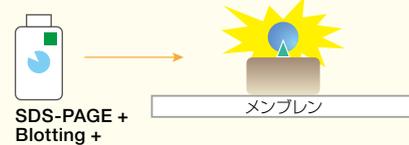
製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
細胞溶解タンパク質発光検出システム			
Nano-Glo® HiBiT Lytic Detection System	10 ml	N3030	26,000
	100 ml	N3040	150,000
	10x100 ml	N3050	1,180,000

※ 10ml は 96 プレートフォーマットで 100 ウェル分に相当

2

プロットングメンブレン上でのタンパク質定量

HiBiT Blotting



HiBiT 付加タンパク質を発現させた細胞を溶解し、SDS-PAGE 泳動、メンブレン転写する。メンブレンに LgBiT および NanoLuc® 基質を含む試薬を添加し、目的タンパク質をバンドとして検出する。

- 試薬を 1 回添加するだけのシンプルな手順
- 30 分以内に実験完了
- 抗体不要・特異的: シグナルは HiBiT と LgBiT の結合でのみ検出

→ 非特異的バンドは検出されない

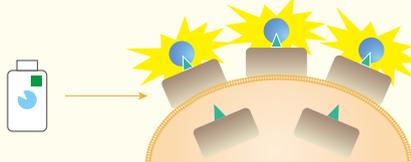
製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
プロットングタンパク質発光検出システム			
Nano-Glo® HiBiT Blotting System	100ml	N2410	36,000

※ 100ml は 10 プロット分に相当

3

生細胞の膜タンパク質、分泌タンパク質の定量

HiBiT Extracellular Detection



HiBiT を付加したタンパク質として発現した膜タンパク質・分泌タンパク質等を細胞を生かしたまま定量する。

検出試薬に含まれる LgBiT は細胞膜非透過性なので細胞表面のタンパク質または細胞外への分泌タンパク質のみ検出できる。シンプルな添加・検出フォーマットにより、受容体の細胞内移行、受容体のリサイクリング、タンパク質分泌、細胞膜移行をリアルタイムで測定可能。

アプリケーション例

- GPCR 受容体の生細胞での内在化定量

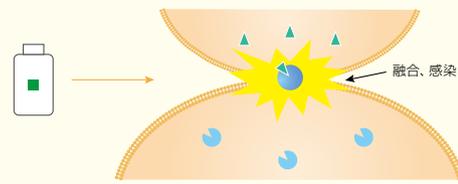
製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
細胞外タンパク質発光検出システム			
Nano-Glo® HiBiT Extracellular Detection System	10 ml	N2420	28,000
	100 ml	N2421	175,000
	10x100 ml	N2422	1,350,000

※ 10ml は 96 プレートフォーマットで 100 ウェル分に相当

4

細胞内タンパク質会合による細胞融合、ウイルス感染の検出

HiBiT Intracellular Detection



※ 本アプリケーションでは 2 つの細胞にそれぞれ LgBiT、HiBiT を発現させる。

2 種類の細胞あるいは細胞とウイルスなどの組み合わせで、それぞれの細胞に LgBiT、HiBiT を発現させ、それらが融合すると自発的に会合し、基質添加により発光定量する。挿入配列の長さ制限のあるウイルスゲノムや CRISPR / Cas9 によるゲノム編集に応用することにより、内在性ゲノム、ウイルスゲノム中の遺伝子のマーカーとして利用可能。

アプリケーション例

- ウイルス感染あるいは複製 (極小 HiBiT がウイルスゲノムへの挿入に好適)
- 細胞融合
- アクセプター細胞への Exosome デリバリー
- 生細胞での細胞内タンパク質の定量

詳細については
お問い合わせください

※ Detection System および Blotting System にはベクターは含まれません。

HiBiT 配列導入ガイド

HiBiT 配列は 33 塩基にコードされる超極小のペプチドタグ (11 アミノ酸) なので、従来法のように HiBiT ベクターへ目的遺伝子をクローニングするだけでなく、短いエピトープタグなどと同様にお手元の標的遺伝子発現クローンへ PCR 法や遺伝子合成により簡便に付加することもできます。また、CRISPR / Cas9 などのゲノム編集技術により内在遺伝子に融合させることも可能です。

● HiBiT 発現ベクターへの標的遺伝子の組み込み

a) Flexi® クローニング



b) MCS クローニング



● 保有する標的遺伝子発現クローンへの HiBiT 配列の組み込み



● ゲノム編集による内在遺伝子への HiBiT 配列の組み込み



コスト	容易性	作業時間	内在レベル発現
○	◎	◎	—
◎	◎	◎	—
◎	○	◎	—
○	○	○	◎

ライセンスについて：▶ ラベルライセンスの内容を承認いただく必要があります (従来のレポーターベクター等と同様)。

▶ ラベルライセンスの内容を承認、登録していただく必要があります (1 分で終了する配列利用に関する簡単な登録です)。

タグ配列の合成については www.promega.co.jp/nanobitsynthesis/ で登録ください。

付録

より詳細な HiBiT クイックスタートガイドについては www.promega.co.jp/hibitquick/ をご覧ください。

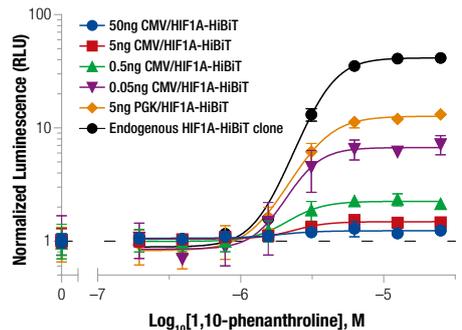


CRISPR / Cas9 ゲノム編集による HiBiT 配列導入

CRISPR / Cas9 ゲノム編集技術を用いて内在ローカスに HiBiT 配列を導入することにより、強力なプロモーターで一過的に過剰発現させる場合に比べ多くの場合応答性が向上し、ありのままのタンパク質発現解析が可能になります。

付録

CRISPR / Cas9 ゲノム編集による HiBiT ノックインプロトコル
<http://www.promega.co.jp/hibitcrispr/>



各発現コンストラクトによる応答性の違い
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的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。

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2018年8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