



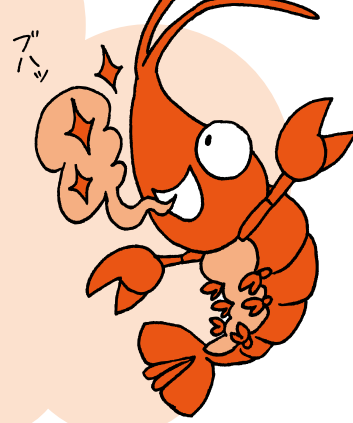
Vol.5

ほたるん

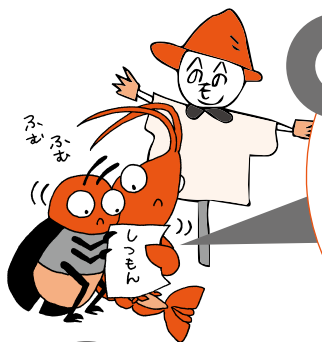
と

エビビン

の



NanoLuc[®]って なにになになーに？



Q

こんにちは、ほたるんさんエビビンさん。

レポーターアッセイ始めました！

もちろんルシフェラーゼのシステムです。

でも私の細胞はトランスフェクション効率が

低くて、コントロールとの差が見えません。

あきらめるしかないのでしょうか？

プロ メガ子より



A

とっても明るいルシフェラーゼ「NanoLuc」で
シグナルを上げればいいんです！

ナノルック

トランスフェクション効率が低いってことは、ちょっとの細胞しかルシフェラーゼを発現しないって
こと、つまり光が少なくて差が見えにくくなってしまいうんだね！そんなときはもっと強力に光る
ルシフェラーゼ「NanoLuc」を使ってシグナルを強くすれば、トランスフェクション
された細胞が少なくても十分にデータがとれるよ！



レポーターアッセイについては
なにになになーに？
のVol.1で復習できるよ！
www.promega.co.jp/naninani/

NanoLuc[®]ってどんなルシフェラーゼ？



比べて
VS
見てみよう



ホタルルシフェラーゼ		NanoLuc
北アメリカ産ホタル	由来	トゲオキヒオドシエビ
61kDa (単量体酵素)	分子量	19kDa (単量体酵素)
ATP、酸素、基質 (ルシフェリン)	光るのに必要なもの	酸素、基質 (フリマジン)
556nm	発光波長	460nm
1	明るさ (比活性：ホタルを1とした場合)	100 以上
数えきれないよ！	レポーターアッセイの実績	伸び盛りだよ！

どちらも
ルシフェラーゼなのに、
いろいろ違うのね



この違いのおかげで
ホタルルシフェラーゼで難しかったことが、
NanoLuc[®]でできるようになったんだ！

もっと詳しく

NanoLuc

明るい!

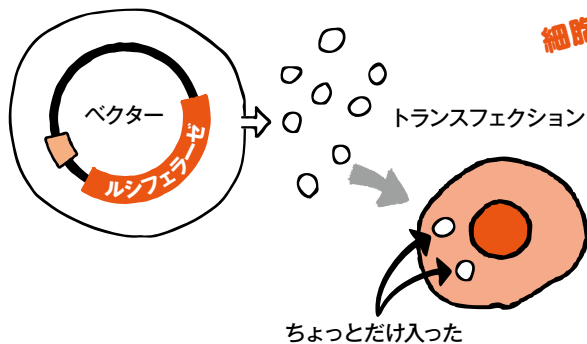
今までレポーターアッセイが難しかった人も、
できるようになったよ!

- トランスフェクション効率が低い細胞を使ってる人
- 発現量少なめの遺伝子を調べている人
- 実験に使える細胞がちょっとしかない人

ネバークライ!!

ネバークラブアップ

トランスフェクション効率が低い場合



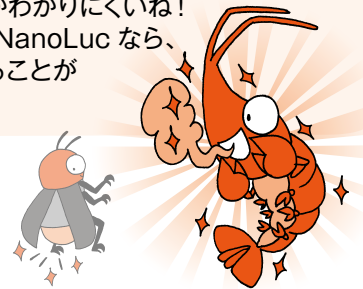
細胞の中では

ルシフェラーゼ遺伝子



入ったベクターが
少ないので、ルシ
フェラーゼの生産
量も少ないね!

少なすぎると暗いホタルルシフェラーゼは
あるかどうかわかりにくいね!
でも明るい NanoLuc なら、
はっきりあることが
わかるね!



小さめ!

1 ウイルスゲノムに
組み込めるよ!



インフルエンザウイルスで
実績があるんだって

2 調べたいタンパク質に
融合しちゃう!

目的タンパク質の遺伝子に
NanoLuc の遺伝子をつなぐよ!

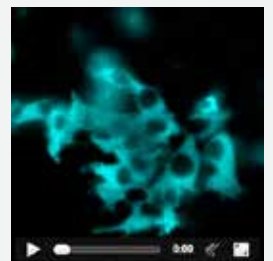
目的タンパク質の遺伝子 NanoLuc 遺伝子

目的
タンパク質



タンパク質が分解される
タイミングを発光値
を測ることで調べら
れるよ!

細胞の中での居場所が
見られるよ!



※「発光顕微鏡」で観察するよ!
(オリンパス社 LV200 など)

ATP いらない!

新しい細胞生存性アッセイができたよ!*

* RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay (カタログ番号 G9711)

細胞生存性アッセイといえば CellTiter-Glo 2.0 だね!

だけど、ときには ATP 以外のもので生存性を調べたい場合だってあるワケ!

基質がミソ



フリマジン
(NanoLuc の基質)
+
化学修飾

使えない

培地に加える

還元
生きた細胞に取り込まれ、
還元されると...

使える

フリマジン
化学修飾がとれる



光る

NanoLuc が光れば
細胞が生きてる

しかも!!
細胞を生かしたまま、72 時間まで
何回も測定し続けられるよ!

「還元能」を生きた
細胞の目印として測定
しているんだ!

CellTiter-Glo 2.0 については
なにになーに?
の Vol.4 で復習できるよ!
www.promega.co.jp/naninani/

プロメガがナイス!

明るい!

青っぱい!

BRET (ブレット)
解析に良いね!

目的タンパク質と他のタンパク質がくっつくか、またはすごく近くに存在するかどうかを調べる方法だよ! プロはこういうのを「タンパク質間相互作用」って言うてるね!

Q タンパク質がくっつくかどうかなんて、なんで調べるんですか?

A 多くのタンパク質は、他のタンパク質とくっついてはじめて機能を発揮するよ! だからどんな相手とくっつくか調べることは、タンパク質の機能を知ることにつながるんだ!

答えるよ!

質問です!

蛍光タンパク質を光らせる方法

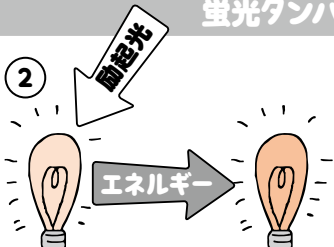
①



蛍光タンパク質

特別な波長の光「励起光」があたると光るね!

②



蛍光タンパク質の蛍光エネルギーが、さらに他の蛍光タンパク質を光らせるよ! FRET (フレット) っていう現象だね!

③



ルシフェラーゼの発光エネルギーで蛍光タンパク質を光らせることもできるんだ!

\\ まめちしき //

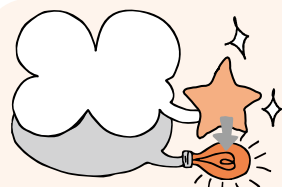
BRET は「生物発光
共鳴エネルギー転移」

(B)ioluminescence
Resonance E(n)ergy
T(ransfer)
の略だよ!

これも「タンパク質間相互作用」の実験に応用すると

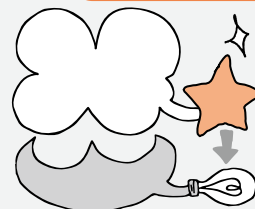


それぞれのタンパク質に、ルシフェラーゼと蛍光タンパク質を融合させるよ!



蛍光が検出できたら、タンパク質がくっついたか、すごく近づいた証拠

生きた細胞で検出できるんだ!



くっつかなければ蛍光は出ないよ!

プロメガかわら版でプロフェッショナルによる **BRET** の体験談が読めるよ!

www.promega.co.jp/pdf/kawara1607_p7.pdf



NanoLuc なら

明るい 発光エネルギーが強いから、蛍光タンパク質を光らせるパワーも強い

青っぱい 蛍光タンパク質が出す光の波長と離れているから、蛍光検出のジャマになりにくい

➡ ホタルのルシフェラーゼより高性能な **BRET** 解析ができる!

Q FRET より BRET の方が良いのかしら?

A BRET は励起光いらずなのが良いところ!

① 励起光で細胞を傷める心配がないよ!

② 細胞の中には他にも蛍光物質がたくさん!

励起光をあてると光っちゃって、検出のジャマになるんだ!

答えるよ!

またまた質問です!

使ってみよう NanoLuc

NanoLucならうまくいきそうな気がする！
レポーターアッセイするなら何が必要なの？

BRETの場合も
だいたいこんな
感じだよ！

ホタルルシフェラーゼのときと同じでオッケー！

必要なもの

1 転写調節領域と NanoLuc を つなげたベクター

好きな
転写調節領域
も入れられるよ！
シグナル伝達配列入り
のもの売ってるよ



2 細胞にベクターを入れるための トランスフェクション試薬

Via Fect が
お気に入り

3 NanoLuc を 光らせる試薬

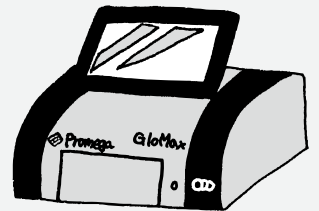
白い
プレートが
いいよ



Renta MAX

ルミノメーターが
なければ
RentaMAXで
借りられるよ！

4 光を測定する ルミノメーター



機器貸出しの RentaMAX
については
www.promega.co.jp/rentamax

お得に試すなら

だけど NanoLuc は
さすがにお高い…

おやっ！？
まさか…!!

プロメガクラブに入会で

製品名	サイズ	カタログ番号	新定価	クラブ価格(¥)
Nano-Glo® Luciferase Assay	10ml	N1110	23,000	18,000
Nano-Glo® Dual-Luciferase® Reporter Assay System	10ml	N1610	39,000	31,000
Nano-Glo® Dual-Luciferase® Reporter Assay/pNL1.1.TK Bundle	1 セット	N1521	80,000	40,000
Nano-Glo® Dual-Luciferase® Reporter Assay/pGL4.54 [luc2/TK] Bundle	1 セット	N1541	80,000	40,000

その他キット、NanoLuc ベクターもお得！
トランスフェクション試薬もお得にトライ！

またまた
プロメガ
クラブで
お得!!

BRET
したい人は
こっちも
見てね！



あきらめていた実験に
NanoLuc で
再びトライ!!

ステップ 1

プロメガクラブ
入会

ステップ 2

NanoLuc ベクター
Nano-Glo®
お得にゲット

ステップ 3

RentaMAX で
ルミノメーター
借りちゃおう！

黄金の 3 ステップ

プロメガクラブ Web site : www.promega.co.jp/promegaclub.html

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2016年10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