

Dual-Luciferase® Reporter Assay System

日本語プロトコール No. TM040J 2003年9月作成

カタログ番号 E1910および E1960

目次

| | | |
|-------|--|----|
| I. | はじめに..... | 1 |
| A. | Dual-Luciferase® Reporter Assay の化学 | 2 |
| B. | Dual-Luciferase® Reporter Assay の構成 | 5 |
| C. | Passive Lysis Buffer | 6 |
| II. | キットの構成 | 7 |
| III. | ウミシイタケルシフェラーゼコントロールレポーターベクター pRL ファミリー..... | 8 |
| A. | pRLベクターの説明..... | 8 |
| B. | pRLベクターを用いた重トランスフェクション実験に関して考慮が必要な重要事項 | 8 |
| IV. | 装置に関する考慮事項..... | 9 |
| A. | シングルサンプル式ルミノメーター..... | 9 |
| B. | マルチサンプル式およびプレート読み込み式ルミノメーター | 9 |
| C. | シンチレーションカウンター | 10 |
| V. | Passive Lysis Buffer を用いた細胞ライセートの調製..... | 10 |
| A. | Passive Lysis Bufferの調製 | 10 |
| B. | マルチウェルプレートで培養した細胞の受動的溶解 | 11 |
| C. | 掻き取り法による細胞の能動的溶解..... | 11 |
| VI. | Dual-Luciferase® Reporter Assayのプロトコール | 12 |
| A. | Luciferase Assay Reagent IIの調製..... | 12 |
| B. | Stop & Glo® Reagent の調製 | 12 |
| C. | 標準的プロトコール | 13 |
| D. | 試薬インジェクターのクリーニングに関して考慮が必要な重要事項..... | 16 |
| E. | アッセイバックグラウンドの測定..... | 17 |
| VII. | 参考文献..... | 19 |
| VIII. | 付録 | 20 |
| A. | バッファーと溶液の組成 | 20 |
| B. | 関連製品の紹介 | 20 |
| IX. | 簡易プロトコール | 22 |

I. はじめに

レポーターシステムは、真核生物の遺伝子発現研究や細胞生理学の研究に広く用いられています。アプリケーションとしては、受容体活性、転写因子、細胞内シグナリング、mRNA プロセッシング、およびタンパク質折り畳みなどの各種研究が挙げられます。デュアルレポーターは、通常、実験精度の向上を目的として用います。“デュアルレポーター”という用語は、1つのシステム内において2つの異なるレポーター酵素を同時に発現させ、測定することを指します。一般に、“試験”レポーターは特定の実験条件が及ぼす影響を反映し、一方、重トランスフェクトした“コントロール”レポーターの活性はベースラインの反応を表わす内部コントロールとなります。試験レポーターの活性を内部コントロールの活

性で標準化することにより、細胞生存性やトランスフェクション効率の違いに起因する実験間のばらつきを最小限に抑えることができます。また、ピペティングの量や、細胞溶解効率、アッセイ効率などのその他のばらつきの原因も効果的に排除することが可能です。つまり、デュアルレポーターアッセイを用いることにより、多くの場合、外的影響が低減され、実験データ解釈の信頼性を高めることができます。

プロメガのDual-Luciferase® Reporter (DLR™) Assay System^(a,b,c) を利用することにより、デュアルレポーターアッセイを効率的に実施することができます。DLR™ Assay では、ホタル (*Photinus pyralis*) ルシフェラーゼ活性とウミシイタケ (*Renilla reniformis*、別名シーパンジー) ルシフェラーゼ活性を同一のサンプルから連続的に測定します。まず、Luciferase Assay Reagent II (LAR II) を添加して“グロータイプ”の発光シグナルを発生させ、ホタルルシフェラーゼレポーターを測定します。ホタルルシフェラーゼによる発光を測定した後、同じチューブにStop & Glo® Reagentを添加してこの反応を消光させると同時に、ウミシイタケルシフェラーゼ反応を開始します。ウミシイタケルシフェラーゼ反応によって、Stop & Glo® Reagentも測定時間中にゆっくりと減衰する“グロータイプ”のシグナルを発生します。DLR™ Assay Systemでは、どちらのレポーターでも感度がattomole以下の直線的なアッセイ結果が得られ、試験する細胞中ではどちらのレポーターも内在性の活性を示しません。また、DLR™ Assayは包括的な構成内容となっていますので、トランスフェクトした細胞でも無細胞系の転写/翻訳反応でも、両方のレポーターを迅速に定量することができます。

カタログ番号E1960に関する注意：96ウェルプレートに対し1ウェルあたり20µlを添加するのに十分な量の溶解用試薬 (Passive Lysis Buffer、PLB) が含まれます。より多量の溶解用試薬 (例えば、> 100µl/well) を要するアプリケーションでは、別途PLBをご購入いただくこともできます (カタログ番号 E1941)。

プロメガではDLR™ Assay System用にデザインされたホタルまたはウミシイタケルシフェラーゼベクター-pGL3^(d,e)、phRL^(c,f,g,h)、pRL^(g) の3種類を用意しています。これらのベクターは“試験”または“コントロール”用レポーター遺伝子を哺乳動物細胞に重トランスフェクションするために使用します。

A. Dual-Luciferase® Reporter Assayの化学

ホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼは進化の起源が異なるため、酵素の構造や基質要求性が異なります。これらの違いを利用すると、それぞれのルシフェラーゼの生物発光反応を選択的に識別することができます。つまり、DLR™ Assay Systemを使用することにより、ホタルルシフェラーゼ反応 (“試験”レポーター) の消光と同時にウミシイタケルシフェラーゼ (“コントロール”レポーター) の発光反応を活性化させることが可能となります。

ホタルルシフェラーゼは 61kDa の単量体タンパク質で、酵素活性のために翻訳後プロセッシングを必要としないため^(1,2)、翻訳後ただちにレポーターとして機能します。フォトン放出は、ATP、Mg²⁺、およびO₂の存在下でホタルルシフェリンが酸化されることによって起こります (図1)。従来の反応条件では、酸化はターンオーバーが非常に遅いルシフェリル-AMP中間体を介して行なわれます。そのため、このアッセイの化学反応では基質と酵素の混合後に瞬間的な光 (“フラッシュ”) が生成され、急速に減衰します。

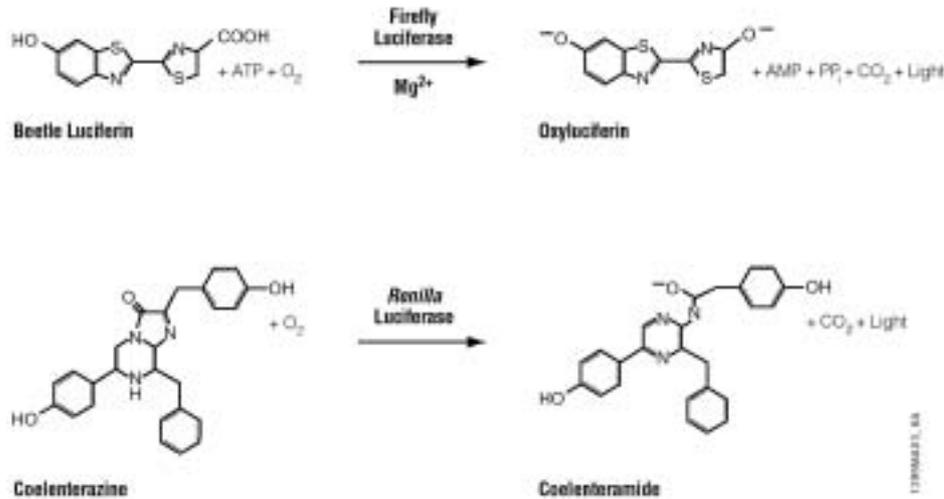


図1. ホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼが触媒する化学発光反応

ホタルルシフェラーゼ定量用のすべてのプロメガのLuciferase Assay Reagents^(a)には、総合的な反応動態の向上を図るために補酵素A (CoA) が添加されています(3)。CoAが加わるにより、このホタルルシフェラーゼアッセイでは持続性の“グロータイプ”の発光シグナルが得られ、シグナル強度も従来のアッセイ化学反応の値より著しく増加します(図2)。また、このルシフェラーゼアッセイはきわめて感度が高く、7桁以上の酵素濃度にわたって直線性が得られます(図3)。

ウミシイタケルシフェラーゼは36kDaの単量体タンパク質で、自然界でこの酵素を元々含有するウミシイタケ (*Renilla reniformis*) から精製した場合、炭水化物が3%含まれています(4)。しかし、ホタルルシフェラーゼと同様に、酵素活性のために翻訳後修飾を必要とせず、翻訳後ただちにレポーターとして機能します。ウミシイタケルシフェラーゼは、O₂と腔腸動物のルシフェリン (coelenterazine) を利用して発光反応を触媒します(図1)。DLRTM Assayの化学反応では、ウミシイタケルシフェラーゼの反応動態により測定時間中にゆっくりと減衰するグロータイプの発光シグナルが得られます(図2)。ホタルルシフェラーゼと同様、ウミシイタケルシフェラーゼによる発光反応もきわめて感度が高く、通常5桁にわたって直線性が得られます(図3)。発光反応の有効範囲は、使用するルミノメーターの種類(例えば96ウェル用とシングルサンプル用)によって異なることがあるため注意が必要です。

coelenterazineに固有の特性として、水溶液中で低レベルの自家発光を生じるという性質があります。この欠点のため、酵素濃度がきわめて低い場合には高い検出感度を得ることが困難となります。また、一般に細胞溶解液の調製に用いられる非イオン性洗剤の中には、自家発光を著しく増強するものがあります (Triton[®] X-100など)。プロメガのDLRTM Assay System には、coelenterazineの自家発光に対して溶解液組成が及ぼす影響を最小限に抑えるように作製されたPassive Lysis Buffer が含まれます。また、DLRTM Assay Systemには Luciferase Assay Reagent IIおよびStop & Glo[®] Reagentという2種類の再溶解したアッセイ試薬が含まれており、これらの混合液にはcoelenterazineの自家発光を抑える働きがあります。このように、DLRTM Assay Systemを使用すれば、調製した細胞ライセート中に発現されているきわめて低レベルのウミシイタケルシフェラーゼコントロール活性に対しても、正確で再現性が高い定量を行なうことができます。

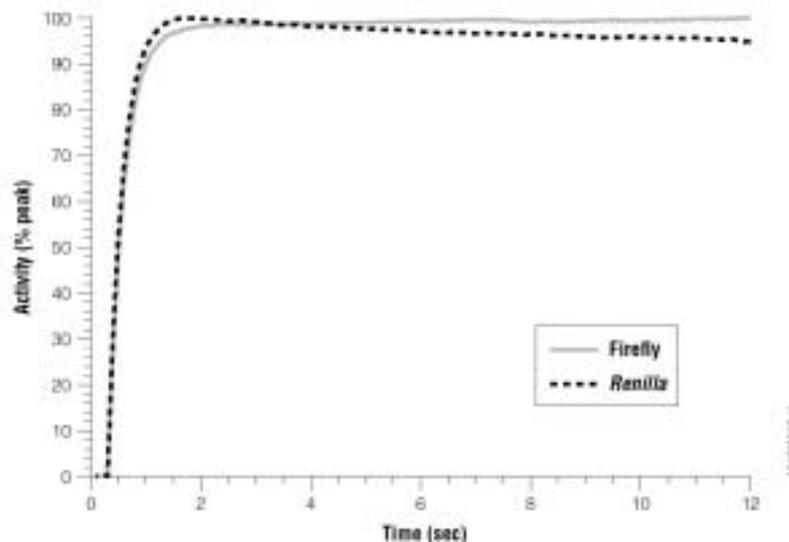


図2. Dual-Luciferase® Reporter 1000 Assay Systemでホタルとウミシイタケのルシフェラーゼにより生成された発光シグナル

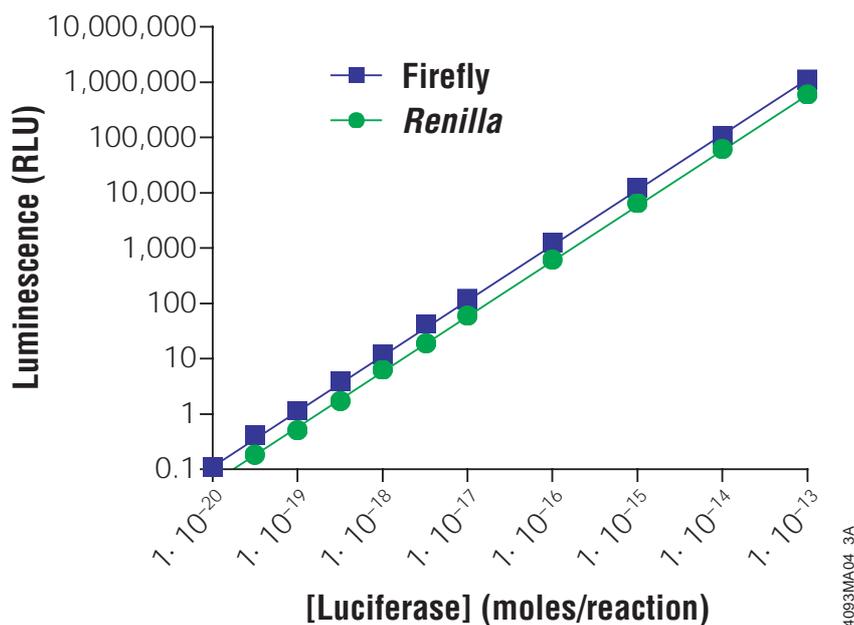


図3. ホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼの直線範囲の比較

DLR™ Assayは、1mg/mlゼラチン含有PLB中に溶解した精製ホタルルシフェラーゼおよびウミシイタケルシフェラーゼ混合液を用いて実施した。測定にはTurner Designs Model 20e Luminometerを使用した。DLR™ Assay Systemを使用した上記グラフが示すとおり、ホタルルシフェラーゼアッセイでは7桁にわたって直線性が得られ、試験レポーター酵素の検出感度は1 femtogram (約 10^{-20} mole) 以下である。ウミシイタケルシフェラーゼアッセイの場合は5桁を上回る直線性が得られ、約30 femtogram (約 3×10^{-19} mole) のコントロールレポーター酵素の検出が可能である。

B. Dual-Luciferase® Reporter Assay の構成

各ルシフェラーゼレポーター酵素から生じる発光シグナルの定量は、ライセート調製の直後に行なうことができ、サンプルの分画や追加の処理を行なう必要はありません。ホタルルシフェラーゼレポーターアッセイは、Luciferase Assay Reagent II にライセートの分画を添加することで開始します。ホタルルシフェラーゼ反応の定量直後、サンプルチューブに Stop & Glo® Reagent を添加し、ホタルルシフェラーゼの消光と同時にウミシイタケルシフェラーゼを活性化させます。ホタルルシフェラーゼ反応による発光シグナルは、Stop & Glo® Reagent 添加後1秒以内に少なくとも10⁵分の1以下 (残存する発光量の0.001%以下) まで消光されます (図4)。この1秒の間に、ウミシイタケルシフェラーゼの活性化も完了します。インジェクター付きでない (マニュアル操作の) ルミノメーターを使用する場合には、両方のルシフェラーゼレポーター活性を定量するのに約30秒を要します。下記に手順を要約します。

| | 時間 |
|---|-------------|
| ステップ1: ルミノメーターチューブに予め分注した Luciferase Assay Reagent II に調製したライセートを手で加え、混合する。 | 3 秒 |
| ステップ2: ホタル (試験) ルシフェラーゼ活性を定量する。 | 12 秒 |
| ステップ3: Stop & Glo® Reagentを加え、混合する。 | 3 秒 |
| ステップ4: ウミシイタケ (コントロール) ルシフェラーゼ活性を定量する。 | 12 秒 |
| DLR™ Assayの合計所要時間 | 30 秒 |

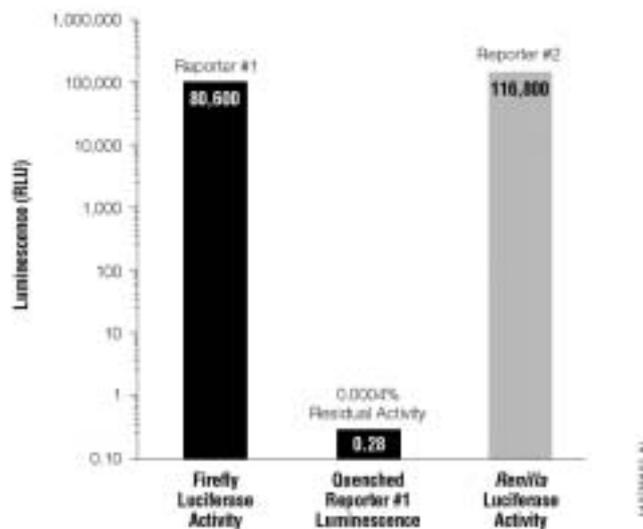


図4 . Stop & Glo Reagent 添加前後のルシフェラーゼ活性の測定

DLR™ Assayでは反応にStop & Glo® Reagent を添加することで、ホタルルシフェラーゼ (レポーター1) に続いてウミシイタケルシフェラーゼ活性 (レポーター2) を連続して測定できる。両方のレポーター活性は、pGL3 Control Vector[®] (カタログ番号 E1741) および pRL-SV40 Vector[®] (カタログ番号 E2231) で重トランスフェクトされたCHO細胞からサンプルライセートを調製し、定量された。Stop & Glo® Reagentによるレポーター1の消光が効率的であることを示すために、等量のStop & Glo® Buffer (ウミシイタケルシフェラーゼの基質を含まない) が加えられた (中央)。ホタルルシフェラーゼの発光は5桁を超えて消光された。

C. Passive Lysis Buffer

Passive Lysis Buffer (PLB) は、接着細胞を掻き取り、凍結融解（能動的溶解）を行なう必要なく、培養哺乳動物細胞を迅速に溶解することができるように特別に作製されています。また、PLBはサンプルの泡立ちを抑えるので、処理細胞のサンプル群をマルチウェルプレートで培養してライセートとして調製し、自動化システムでアッセイするというハイスループットのアプリケーションに最適です。PLBは受動的溶解用に調製されていますが、その強い溶解性能は、標準的な培養プレートに培養された接着細胞を能動的溶解によって回収する場合にも有効です。培養哺乳動物細胞では、ホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼレポーター酵素の細胞ライセート中への放出は、用いた溶解方法に関係なく定量的で、信頼性ある結果が得られます (図5)。

PLB は溶解性にすぐれているだけでなく、ホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼレポーター酵素の性能と安定性を最適にする組成となっています。PLBの重要な特長は、他の細胞溶解試薬と違ってcoelenterazineの自家発光がほとんどないということです。そのため、DLR™ Assay Systemを用いたホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼ活性定量用として細胞を処理する場合は、PLBは最適な溶解試薬となります。その他の細胞溶解試薬（例: Glo Lysis Buffer, Cell Culture Lysis ReagentおよびReporter Lysis Buffer）では実質上のバックグラウンド発光が増加し、受動的溶解にも不適切です。PLBで調製した細胞ライセートのタンパク質量は、必要に応じ、一般に用いられるさまざまな化学アッセイ法を用いて容易に定量することができます。タンパク質量には、適切なコントロールを用いる必要があります。Passive Lysis Bufferがバックグラウンドの吸光度に及ぼす影響を減らすため、ライセートの希釈には、洗剤や還元剤を含まない水またはバッファーを使用することをお勧めいたします。BSAを使った標準曲線を、同じバッファー条件で同時に作成する必要があります。

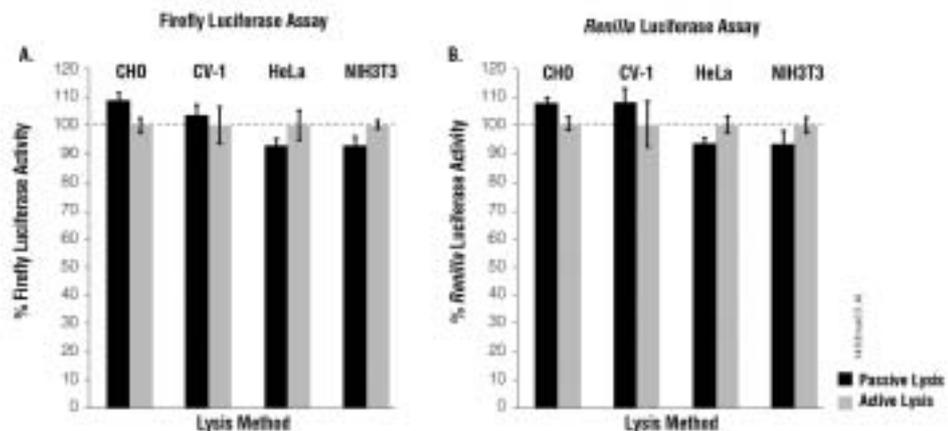


図5. 受動的溶解あるいは能動的溶解のいずれかを用いて **Passive Lysis Buffer** で調製した細胞ライセート中のホタルルシフェラーゼおよびウミシイタケルシフェラーゼのレポーター活性の比較

4つの異なる哺乳類細胞にホタルルシフェラーゼ発現ベクターとウミシイタケルシフェラーゼ発現ベクターを重トランスフェクトした。ライセートは、接着細胞をPassive Lysis Buffer中で15分間インキュベートして（受動的溶解）または接着細胞をPassive Lysis Buffer中で掻き取り、続いて1度凍結融解（能動的溶解）して調製した。比較のためにレポーター活性はそれぞれの細胞の種類について能動的溶解を行って得られた値で標準化した。

II. キットの構成

| 製品名 | サイズ | カタログ番号 |
|--|-------|--------|
| Dual-Luciferase® Reporter Assay System | 100回分 | E1910 |

各システムには標準的なDual-Luciferase® Reporter Assaysを100回行うために十分な試薬が含まれます。次の試薬が含まれます。

| | |
|-------|------------------------------------|
| 10ml | Luciferase Assay Buffer II |
| 1バイアル | Luciferase Assay Substrate (凍結乾燥品) |
| 10ml | Stop & Glo® Buffer |
| 200µl | Stop & Glo® Substrate, 50 × |
| 30ml | Passive Lysis Buffer, 5 × |
| 1 | Protocol |

| 製品名 | サイズ | カタログ番号 |
|--|---------|--------|
| Dual-Luciferase® Reporter Assay System, 10-Pack | 1,000回分 | E1960 |

各システムには96ウェル発光測定用プレートを用いて標準的なDual-Luciferase® Reporter Assaysを1,000回行うのに十分な試薬が含まれます。次の試薬が含まれます。

| | |
|------------|------------------------------------|
| 10 × 10ml | Luciferase Assay Buffer II |
| 10 × 1バイアル | Luciferase Assay Substrate (凍結乾燥品) |
| 10 × 10ml | Stop & Glo® Buffer |
| 10 × 200µl | Stop & Glo® Substrate, 50 × |
| 30ml | Passive Lysis Buffer, 5 × |
| 1 | Protocol |

保存条件：Dual-Luciferase® Reporter Assay Systemは、到着後 - 20 で保存してください。Luciferase Assay Substrateは、再溶解後使用量ずつに分注してください。Stop & Glo® Substrate (Substrate + Substrate Solvent) は、Stop&Glo® Reagent (Substrate + Buffer) は用事調製することが理想的です。必要な場合、活性を落とすことなく -20 で15日間保存できます。22 で48時間保存した場合の試薬の活性低下は8%、4 で15日間の場合は13%です。Stop&Glo® Reagentの室温融解は6回までで、活性の低下は 15%です。

カタログ番号E1960の製品に関して、溶解試薬がさらに必要なアプリケーションを行う場合 (例えば100枚/ウェル以上) は、別にPassive Lysis Buffer をご購入いただけます (カタログ番号E1941)。

プロメガの全ての
Technical Bulletins は
インターネットでご覧いた
だけます。
www.promega.com

III. ウミシイタケルシフェラーゼレポーターベクター-phRL およびpRLファミリー

A. phRLおよびpRLベクターの説明

ウミシイタケルシフェラーゼレポーターベクターのphRLおよびpRLファミリーには、*anthozoan coelenterate Renilla reniformis*からクローニングしたウミシイタケルシフェラーゼ (Rluc)[®]のcDNAが組込まれています。両ウミシイタケレポーターベクターシリーズは実質上同じタンパク質をコードしており、どちらとも“試験”または“コントロール”レポーター遺伝子として使用することができます。

pRLベクターに含まれるウミシイタケルシフェラーゼをコードするDNAは、ネイティブなDNA配列で、レポーター遺伝子として利便性を高めるためにマイナー修飾が施されています。しかしphRLベクター内のウミシイタケルシフェラーゼDNAは、哺乳動物細胞で使用するためにコドンが最適化され、多くの転写シグナル配列が除去された合成配列です（詳細についてはTechnical Manual™ 237 [phRL Vectors]およびTechnical Manual TB237, TB238, TB239, TB240 [pRL Vectors]）。phRLおよびpRL遺伝子の違いは、アミノ酸1箇所のみで、タンパク質のN末端付近に位置しています。

B. 重トランスフェクション実験に関して考慮が必要な重要事項

ホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼベクターは、共に哺乳動物細胞に重トランスフェクションするために使用できます。ホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼとも“コントロール”または“試験”レポーター遺伝子として使用できます。しかし、重トランスフェクトしたプラスミドのプロモーター間のトランス効果により、レポーター遺伝子の発現が影響をうける可能性があることを、認識しておく必要があります(6)。これは、コントロール用レポーターベクターまたは試験用レポーターベクターのどちらか一方、あるいは両方に非常に強力なプロモーター/エンハンサーエレメントが組込まれている場合に特に重要です。このような効果の発生の程度は、重トランスフェクトされたベクター上の遺伝子制御因子の組み合わせや活性、細胞に導入された試験用ベクターとコントロール用ベクターの相対比、およびトランスフェクトされた細胞種によって異なります。

試験用およびコントロール用のレポーター遺伝子を確実にそれぞれ独立して発現させるため、プロメガでは、予備的な重トランスフェクション実験を行なってベクターのDNA量とトランスフェクション混合液に添加するコレポーターベクターの比率を最適化していただくよう推奨しています。ホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼアッセイはどちらもきわめて感度が高く、ルミノメーターでの直線範囲もかなり幅があるため（通常、5~6桁）、試験とコントロールの発光値が著しく異なっても正確な測定を行なうことが可能です。したがって、低レベルで安定的なウミシイタケルシフェラーゼコントロール活性の発現を得るには比較的少量のpRLベクターを添加すれば済みます。試験用ベクターとコレポーター用ベクターの比は、10対1から50対1（またはそれ以上）を用いることができ、これはプロモーターエレメント間のトランス効果を抑えるためにもきわめて有用といえます。

IV. 装置に関する考慮事項

A. シングルサンプル式ルミノメーター

ウミシイタケルシフェラーゼとホタルルシフェラーゼは、どちらもグロータイプの反応動態を示します。したがって、少検体のアプリケーション向けに設計されたシングルサンプル式ルミノメーターの場合、DLR™ Assayの実施に試薬インジェクターを用いる必要はありません。ルミノメーターは、“フラッシュ”の強度や“ピーク”高を測定する場合とは異なり、所定時間中の発光量を測定するように設定する必要があります。標準的な DLR™ Assayでは、ルミノメーターを2秒間の待機後に10秒間測定するように設定することをお勧めします。しかし、装置の種類や処理サンプル数によっては、待機時間や発光測定時間をもっと短縮したい場合もあるかもしれません。ルミノメーターにコンピューターやオンラインプリンターを装備して出力データを直接取り込めば、レポーターアッセイのたびに操作を一旦停止して手で測定値を記録する必要がなくなるため、より便利です。試薬インジェクターを1本または2本装備したシングルチューブ式ルミノメーターのなかには、DLR™ Assayの“読み込み - 注入 - 読み込み”フォーマットのプログラムが困難または不可能な製品があります。このような場合は、インジェクターシステムを無効にして、試薬の添加を手で行なうことをお勧めいたします。

Turner Designs Model TD-20/20 Luminometerは、シングルまたはデュアルオートインジェクターシステム (カタログ番号E2351またはE2061) およびプリンターを装備しており、少検体のDLR™ Assay 処理用として最適なルミノメーターです。TD-20/20 Luminometerは、“Start” ボタンを押すだけで試薬の注入からホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼレポーター活性の連続的な読み込みまでを完了できるように予めプログラムされています。また、この装置では個々のルシフェラーゼ活性値と標準化した値を求めるようプログラムされており、同種サンプルの測定値を統計学的に解析することもできます。

B. マルチサンプル式およびプレート読み込み式ルミノメーター

多検体のDLR™ Assayを実施する場合は、複数のサンプルチューブを処理可能なルミノメーターを使用するか、アッセイを96ウェルで行なってプレート読み込み式ルミノメーターを使用するのが最も簡便です。ハイスループットのアプリケーションの場合には、最初に各アッセイチューブまたはマイクロプレートの各ウェルに、それぞれのサンプルを所定量ずつ分注しておくことをお勧めいたします。その後、下記の手順にしたがってデュアルレポーターアッセイを実施します。1) Luciferase Assay Reagent IIを添加する。2) ホタルルシフェラーゼ活性を測定する。3) Stop & Glo® Reagentを添加する。4) ウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定する。したがって、DLR™ Assayを行なうには、マルチサンプル式およびプレート読み込み式ルミノメーターに少なくとも2本の試薬インジェクターが装備されていなければなりません。ハイスループット用機器を使用すれば、DLR™ Assayにかかる待機時間と測定時間を、標準的アッセイプロトコールに記載された時間よりもかなり短縮できると考えられます。

備考：ルシフェラーゼによって得られる発光反応の強度が、ルミノメーターの直線範囲を超えることは珍しくありません。サンプル発光が光電子増倍管の直線範囲を超えた場合に、ご使用のルミノメーターが診断警告を発するかどうか確認しておいてください。このような警告機能がない場合には、ルシフェラーゼレポーターアッセイを実施する前にルミノメーターによる検出の直線範囲を確定しておくことが重要です。各ルミノメーターの動作範囲は、精製したルシフェラーゼ (QuantiLum™ Recombinant Luciferase; カタログ番号 E1701など) や、細胞溶解液中に発現されたルシフェラーゼを用いて測定することでできま

測定したサンプルの発光が光電子増倍管の直線範囲を超えたときに、お使いのルミノメーターが診断警告を発するかどうかを確認してください。

す。1mg/mlゼラチンを含む1×PLB (セクション V.Aを参照) にルシフェラーゼサンプルの段階希釈を作成します。希釈倍率がきわめて高い検体では、ルシフェラーゼ酵素の安定性を保つため外来タンパク質を添加する必要があります。

C. シンチレーションカウンター

通常、統合されたDLR™ Assay化学を用いてホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定する場合、シンチレーションカウンターの使用はお奨めしません。シンチレーションカウンターにはオートインジェクターが装備されていないため、Dual-Luciferase® フォーマットを用いてサンプルのアッセイを行う場合、手動で操作しなければなりません。両ルシフェラーゼから生じる発光シグナルは、反応時間中ゆっくりと減衰 (図2) するので、シンチレーションカウンターはマニュアルモードで操作する必要があり、各反応は測定の前開始させなければなりません。これはホタルルシフェラーゼ反応よりも速く減衰するウミシイタケルシフェラーゼ反応の場合は特に重要です。この減衰を考慮し、反応開始から測定までの経過時間をコントロールすることも重要です。

ホタルまたはウミシイタケルシフェラーゼ活性の測定にシンチレーションカウンターを使用する場合、全てのチャンネルを開き、一致回路をオフにしてください。これらは通常プログラムメニューオプションや装置のスイッチングによりセットできます。回路をオフにできない場合、ルシフェラーゼ濃度とcpmの直線関係はcpm (counts per minute) 測定値からバックグラウンドcpmを差引いた値の平方根 (例: [サンプル/バックグラウンド]^{1/2}) として計算されます。バックグラウンドの測定についてはセクションVI. Eをご覧ください。

V. Passive Lysis Bufferを用いた細胞ライセートの調製

PLBを用いた細胞ライセートの調製手順として2種類の方法を紹介します。最初に紹介する手順は、マルチウェルプレート内の細胞の受動的溶解を行なう場合にお勧めする方法です。2番目の手順は、培養用プレートで増殖した細胞の回収に適した方法で、接着細胞を掻き取ることによって手早くライセートを調製したい場合に使用します。どちらの手順で調製した場合にも、PLBを使って調製した細胞ライセートのホタルルシフェラーゼおよびウミシイタケルシフェラーゼは、室温 (22 °C) で6時間以上、氷上では最長16時間安定です。調製した溶解液の短期保存 (最長1ヵ月) には、-20 °Cでの凍結が適しています。しかし、長期保存には-70 °Cをお勧めいたします。凍結融解を2~3回以上繰り返すと、細胞ライセートのルシフェラーゼレポーター酵素活性は徐々に失われる可能性があります。

準備するもの

(溶液の組成はセクションVIII. Aをご覧ください)

リン酸緩衝液(PBS)

A. Passive Lysis Buffer の調製

PLBは5×濃縮液としてご提供しています。5×Passive Lysis Bufferを、4倍量の蒸留水に添加し、十分に混和して必要量の1×使用濃度溶液を調製する。希釈した(1×) PLBは、4 °Cで最長1ヵ月間保存できます。しかし、PLBは必要量を用時調製することをお勧めいたします。5×PLBは-20 °Cで保存してください。

このTechnical Manualの最後に簡易プロトコールがあります。

 DLR™ Assay SystemではPassive Lysis Bufferだけをお使いください。PLBはバックグラウンドの自家発光を最少にする組成となっています。

B. マルチウェルプレートで培養した細胞の受動的溶解

1. 予定しているライセート調製時に細胞が95%以上のコンフルエントとならないように、トランスフェクションパラメータ（すなわち、播種時の細胞密度および培養時間）を決定する。培養細胞から増殖培地を除去し、十分量のリン酸緩衝溶液（PBS）を穏やかに添加して、培養容器の内側表面を洗浄する。容器を軽く回転させ、剥がれた細胞と残った増殖培地を取り除く。洗浄液は、PLB試薬を添加する前に完全に除去する。
2. 各培養ウェルに、細胞単層を完全に覆うのに必要な最小量の1×PLBを分注する。下記に、ウェル当たりの推奨最小 PLB 量を示します。

| マルチウェルプレート | 1×PLB |
|-------------|-------|
| 6ウェル培養プレート | 500μl |
| 12ウェル培養プレート | 250μl |
| 24ウェル培養プレート | 100μl |
| 48ウェル培養プレート | 65μl |
| 96ウェル培養プレート | 20μl |

3. 培養プレートをシーソー式プラットフォームまたは旋回型シェーカーに設置し、1×PLBが細胞単層を完全かつ均一に覆うように穏やかに振とうする。培養プレートの振とうは、室温で15分間行なう。
4. 溶解液をチューブまたはバイアルに移し、以降の操作および保存に供する。別法として、培養プレートのウェル内で直接レポーターアッセイを実施することもできます。一般的に DLR™ Assay実施前にライセートから細胞残さを取り除く必要はありません。しかし、このライセートでタンパク定量を行なう場合は、トップスピードで30秒間の冷却遠心を行なって細胞残さを取り除いておくことをお勧めいたします。ライセートの上清は新しいチューブに移し、レポーター酵素の分析に使用します。

備考：

1. 過増殖した培養細胞では溶解に対する抵抗性が増大していることが多く、受動的溶解を完全に行なうには、一般にPLBの追加や処理時間の延長が必要となります。ホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼは、PLBで調製した細胞ライセート中では安定なため(7)、受動的溶解の処理が長引いてもレポーター活性が損なわれることはありません。
2. 受動的溶解した細胞を顕鏡すると、細胞種によって見かけ上異なる溶解結果が得られる場合があります。多くの培養細胞は、PLB処理により、15分以内に細胞構造まで完全に溶解されます。しかし、一部の細胞種では、PLB処理後に培養ウェル上に識別可能な細胞の輪郭が残ったり、浮遊する細胞残さの大きな塊が見られることがあります。このように細胞残さが見られる場合でも、通常どちらのルシフェラーゼレポーター酵素も15分以内の処理で完全に溶解されることが確認されています（図5を参照）。しかし、培養細胞の種類によっては固有の溶解抵抗性が非常に強く、処理条件の最適化が必要となる場合もあります。

C. 掻き取り法による細胞の能動的溶解

1. 培養細胞から増殖培地を除去し、十分量のPBSを穏やかに添加して培養容器の底部を洗浄する。容器を軽く回転させ、剥がれた細胞と残存する増殖培地を取り除く。洗浄液は、1×PLB試薬を添加する前に完全に除去するようにします。
2. 1×PLB存在下で培養皿から細胞を手で掻き取ることにより、均質なライセートを迅速

 細胞の種類によっては溶解に対して固有の強い抵抗性を示すことがあるため、処理条件の最適化が必要な場合があります。

に調製することができます。下記に、培養皿当たりの推奨最小PLB量を示します。

| 細胞培養プレート | 1 × PLB |
|---------------|---------|
| 100 × 20mm培養皿 | 1.00ml |
| 60 × 15mm培養皿 | 400μl |
| 35 × 12mm培養皿 | 200μl |
| 6ウェル培養プレート | 250μl |
| 12ウェル培養プレート | 100μl |

3. PLB添加後、使い捨てのプラスチック製セルリフターやラバーポリスマンを使って勢いよく掻き取るにより、細胞を迅速に回集することができます。プレートを傾け、ライセートを低い側に掻き落とす。集まったライセートを数回ピペティングし、均質な懸濁液とする。1つのスクレイパーを2サンプル以上の調製に用いる場合は、使用の都度、スクレイパーを完全に洗浄してください。
4. ライセートをチューブまたはバイアルに移し、以降の操作および保存に供する。細胞ライセートを1~2回凍結融解して、細胞を完全に溶解する。一般的にDLR™ Assay実施前にライセートから細胞残さを取り除く必要はありません。しかし、このライセートでタンパク定量を行なう場合は、30秒間の冷却遠心を行なって細胞残さを取り除くことをお勧めいたします。ライセートの上清は、レポーター酵素の分析の前に新しいチューブに移します。

このTechnical Manualの最後に簡易プロトコールがあります。

VI. Dual-Luciferase® Reporter Assayのプロトコール

準備するもの

- ・ルミノメーター
- ・シリコンコートしたポリプロピレンチューブまたは小さなガラスバイアル

A. Luciferase Assay Reagent II の調製

付属の凍結乾燥Luciferase Assay Substrateを、同じく付属のLuciferase Assay Buffer II 10mlに懸濁して、Luciferase Assay Reagent II (LAR II) を調製する。基質とバッファーを混和したら、識別が容易となるよう、既存のバイアルラベルに“LAR II”と記入しておく。LAR IIは-20℃で1ヵ月、-70℃で保存した場合は1年間安定です。

備考：

1. この試薬は、凍結融解を繰り返すとアッセイ性能が低下します。プロメガでは、それぞれの実験用にLAR II を分注しておくようお勧めしています (たとえば、1mlの分画はアッセイ10回分です)。
2. LAR II の成分は熱感受性です。凍結保存した本試薬の分画は、室温の恒温槽で解凍してください。
3. 解凍の過程において、LAR II 内には密度および組成の勾配が生じます。解凍した試薬は、バイアルを数回転倒混和するか、穏やかにボルテックスしてからご使用ください。

B. Stop & Glo® Reagentの調製

必要な回数のDLR™ Assay (1アッセイあたり試薬100μl使用) 分を調製してください。Stop&Glo® Substrateは50X濃度で供給されます。ガラスまたはシリコンコートしたポリプ

 LAR II の代わりにプロメガのLuciferase Assay Reagent (カタログ番号E1500、E1501、E4030、E4530、E4550、およびE1483に含まれる) を使用しないでください。DLR™ Assay Systemで使用するように作製されていません。

ロピレンチューブに1倍量のStop & Glo® Substrateおよび50倍量のStop & Glo® Bufferを加えます。

Stop&Glo® Reagent (Substrate + Buffer) 用事調製がもっとも適しています。22℃、48時間の保存により試薬の活性は約8%低下します。-20℃で15日間、活性を損なうことなく保存できます。6回までであれば15%の活性低下で解凍使用できます。

目的のDLR™ Assay数に適した量を調製する(アッセイ当たり試薬100μl)。ガラスバイアルまたはシリコンコートしたポリプロピレンチューブを使用して、溶解調製した50× Stop & Glo® Substrate (手順1で調製) に、50倍量のStop & Glo® Bufferを添加する。

実施例1 (アッセイ10回分)

1mlのStop & Glo® Bufferをガラスバイアルまたはシリコンコートしたポリプロピレンチューブに分注し、20μlの50× Stop & Glo® Substrateを添加する。この操作でアッセイ10回分に十分な Stop & Glo® Reagentを調製することができます。

実施例2 (アッセイ100回分)

ガラスバイアルまたはシリコンコートしたポリプロピレンチューブに、10mlのStop & Glo® Bufferを分注する。このStop & Glo® Buffer 10mlに、200μlの50× Stop & Glo® Substrateを添加する。この操作により、DLR™ Assay100回分に十分な Stop & Glo® Reagentを調製することができます。

注：調製後の試薬を凍結保存した場合は、室温の恒温槽で解凍してください。試薬は、解凍により密度および組成の勾配が生じますので、必ず混合してからご使用ください。

C. 標準的プロトコール

ホタルルシフェラーゼ活性およびウミシイタケルシフェラーゼ活性の両アッセイは、反応チューブを用いて連続的に実施します。下記に、インジェクター付きでないルミノメーター、または試薬インジェクター1本を装備したルミノメーターを使用する場合のプロトコールを記載します(図6)。

phRLまたはpRLベクターをトランスフェクションした細胞のライセートを用いて、ウミシイタケルシフェラーゼのみのレポーター活性を測定したい場合、Renilla Luciferase Assay System^(c.0) (カタログ番号 E2810, E2820) の使用を推奨します。ウミシイタケルシフェラーゼだけの活性測定にDLR™ Assay Systemを使用する場合は、ウミシイタケルシフェラーゼのアッセイ条件を最適にするために、20μlの細胞溶解液に対してLAR IIおよびStop & Glo® Reagentを各100μl添加する必要があります。

1. 目的の数のDLR™ Assayを行なうのに必要な本数のルミノメーター用チューブを用意し、100μlのLAR II を予め分注する。
2. ルミノメーターを、各レポーターアッセイ当たり2秒間の待機後に10秒間測定するように設定する。
3. LAR II を添加したルミノメーター用チューブに最大20μlの細胞溶解液を注意しながら移し、2~3回ピペティングして混和する。チューブをルミノメーターに設置し、読み込みを開始する。

備考：この手順では、溶液をボルテックスすることをお薦めしていません。ボルテックスすると、チューブの側壁が発光液の薄膜でコートされ、その部分が次に添加したStop &

 このプロトコールを始める前に、LAR II と Stop & Glo® Reagentが新たに調製されたか、あるいは室温の恒温槽で融解されたことを確認してください。

 ステップ3ではボルテックスを行わないでください。

Glo® Reagentと混和されない恐れがあります。Stop & Glo® Reagentを自動注入によりチューブに分注する場合は、この点が大きな問題となります。

4. ルミノメーターに、プリンターもコンピューターもオンライン接続されていない場合は、ホタルルシフェラーゼ活性測定値を手で記録する。
5. 試薬インジェクターが使用可能な場合は、インジェクターで100µlのStop & Glo® Reagent を分注する。インジェクター付きでないルミノメーターを使用する場合は、ルミノメーターからサンプルチューブを取り出して100µlのStop & Glo® Reagentを添加し、軽くボルテックスして混和する。サンプルをルミノメーターに戻し、読み込みを開始する。

備考：DLR™ Assay試薬をオートインジェクターシステムに充填する際、試薬を損失することはまずありません。LAR II または Stop & Glo® アッセイ試薬をインジェクターに充填するときは、まずインジェクターシステムから保存液（脱イオン水またはエタノール洗浄液、セクション VI.D の手順 2 を参照）を完全に除去しておくことをお勧めします。空のインジェクターシステムにアッセイ試薬を充填すれば、充填後の試薬の希釈やコンタミを防ぐことができます。つまり、充填した量の試薬を回収して、バルク試薬のリザーバーに戻すことが可能となります。

6. ルミノメーターに、プリンターもコンピューターもオンライン接続されていない場合は、ウミシイタケルシフェラーゼ活性を手で記録する。
7. 反応チューブを廃棄し、次のDLR™ Assayに移る。

 空にしたインジェクターシステムに Assay Reagentを注入することで、注入した試薬の希釈やコンタミを防ぐことができます。

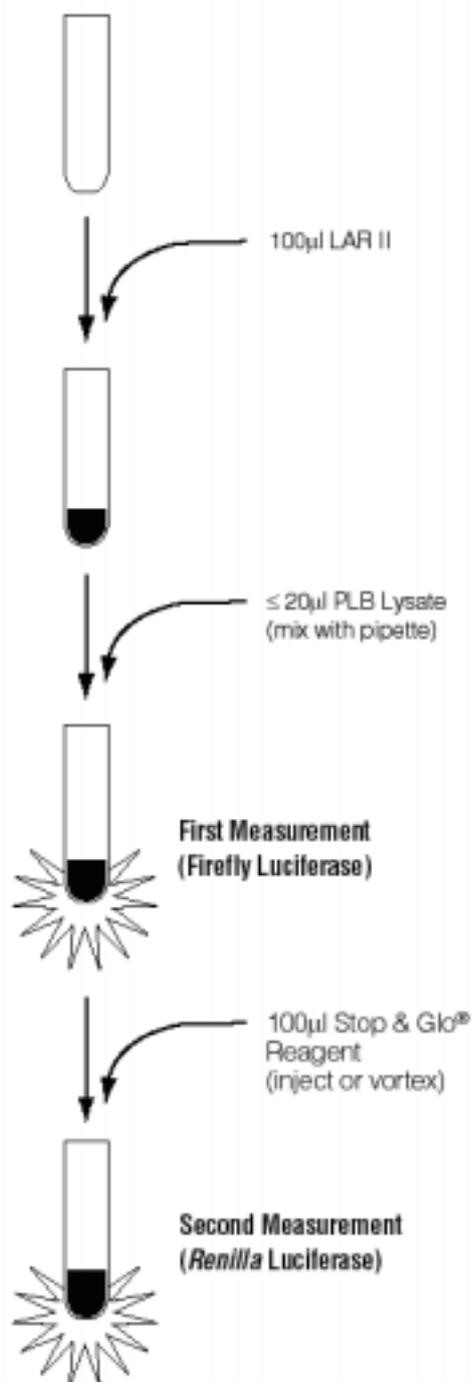


図6. インジェクター付きでないルミノメーターまたは1本の試薬インジェクターを装備したルミノメーターを用いたDLR™ Assayの形式

装置に2本のインジェクターが装備されている場合は、ライセートをルミノメーターチューブに予め分注し、LAR IIおよびStop & Glo® Reagentを続けて自動注入するほうが良いでしょう。

❗ 空にしたインジェクターシステムに Assay Reagent を注入することで、注入した試薬の希釈やコンタミを防ぐことができます。

D. 試薬インジェクターのクリーニングに関して考慮が必要な重要事項

Stop & Glo® Reagent に含まれるルシフェラーゼ消光成分のうち、1成分はプラスチック素材に中程度の親和性を示します。この成分は、オートインジェクターシステムの構造に一般的に用いられているプラスチック製チューブやポンプ本体の内表と、可逆的に会合します。Stop & Glo® Reagent と接触したインジェクターチューブを適切にクリーニングしておかないと、次にそのインジェクターシステムを通過する溶液に痕跡量の消光試薬が浸出してしまいます。このような場合、混入する消光試薬はきわめて微量であっても、ホタルルシフェラーゼレポーター活性を強く阻害します。したがって、LAR II オートインジェクターによるホタルルシフェラーゼアッセイを1本のインジェクターシステムで実施する場合は、Stop & Glo® Reagent 使用後に必ずインジェクターシステムの適切なクリーニングを行うことが重要です。2種類の試薬それぞれに専用のインジェクターを使用することをお勧めいたします。インジェクターを1本使用する場合も2本使用する場合も、以下の洗浄プロトコルによりラインを清浄に保ち、装置を良好な状態に維持することが重要です。

一般的インジェクター用洗浄プロトコル

1. ポンプのボイドボリュームの3倍量に相当する脱イオン水で注入・洗浄を繰り返し、インジェクターラインから Stop & Glo® Reagent を除去する。
2. 洗浄試薬として70%エタノールを調製する。システムに70%エタノールを5ml以上通し、ボイドボリュームの完全な置換とインジェクターチューブの洗浄を行なう。インジェクターをこの洗浄液に30分間浸漬してから、脱イオン水ですすぐほうが望ましい。

注：インジェクターシステムの構造に使用されているデザインや材質はきわめて多様で、ポンプによっては洗浄試薬に30分以上浸漬しないと表面を完全にはクリーニングできないものもあります。Teflon® チューブを使用したルミノメーターは問題ありませんが、Tygon® のような他のチューブの場合、インジェクターシステムから Stop & Glo® Reagent を完全に除去するには12～16時間にわたって(一晚)長時間浸漬する必要があります。
3. ポンプのボイドボリュームの3倍量に相当する脱イオン水ですすぎ、痕跡量のエタノールまで完全に除去します。

Turner Designs TD-20/20 Luminometerインジェクター用の洗浄プロトコル

TD-20/20 Luminometer の場合、インジェクターチューブ内の液を100%置換するには、5回以上の注入サイクルを行なう必要があります。次の方法にしたがい、TD-20/20 Luminometer のインジェクターシステムから痕跡量の Stop & Glo® Reagent のコンタミを除去してください。

1. 脱イオン水を使用して10回の注入サイクルを実施し、インジェクターから Stop & Glo® Reagent を除去する。
2. 70%エタノールを使用して10回以上の注入サイクルを行なったのち、チューブをこの洗浄液に30分間浸漬する。
3. 脱イオン水を使用して10回以上の注入サイクルを行ない、痕跡量のエタノールまで完全に除去する。

E. アッセイバックグラウンドの測定

ルシフェラーゼレポーターの発現は、バックグラウンドレベルを上回る量の発光として定量されます。ほとんどの場合、バックグラウンドはきわめて低い値であるため、ルシフェラーゼ活性は総発光値に直接比例します。しかし、きわめて微量のルシフェラーゼを測定する場合には、総発光値からバックグラウンドシグナルを差し引くことが重要です。以下のセクションでは、ホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼのそれぞれについて、バックグラウンドシグナルの測定方法を紹介します。

ホタルルシフェラーゼ

ごく稀な例外を除き、ほとんどのホタルルシフェラーゼ測定バックグラウンドは装置またはサンプルチューブに起因するものです。サンプルチューブに起因するバックグラウンドは、静電気またはりん光によるものと考えられます。特に、ポリスチレンチューブは大量の静電気を蓄積するため、持続的な高レベルのバックグラウンド発光が生じる可能性があります。チューブの取り扱いおよび保存は、帯電が最小となるように注意して行なう必要があります。サンプルは発光を測定する前に日光や強い光にあたらないように取り扱わなければなりません。

ルミノメーターによっては、電気的設計がバックグラウンドシグナルの測定レベルに多大な影響を及ぼす場合があります。多くのルミノメーターは、発光サンプルがない状態で“0”を読み込むことができません。装置およびサンプルチューブに起因するバックグラウンドシグナルの測定は、次の手順にしたがって実施してください。

1. Passive Lysis Bufferを用いて、トランスフェクトしていないコントロール細胞の溶液を調製する。
2. 100µl の LAR II に20µlのコントロール細胞溶解液を添加する。
3. 見かけ上の発光活性を測定する。

哺乳動物細胞の溶解液は内因性の発光活性を呈さないため、コントロール細胞溶解液の見かけ上の低い発光は、装置またはサンプルチューブ、プレートに起因するバックグラウンドです。バックグラウンドシグナルの相対的ノイズはきわめて高い値となることがよくあり、注意が必要です。したがって、装置およびサンプルチューブ、プレートに起因する統計的に有意なバックグラウンド値を得るには、読み込みを5~10回行なって、それらの平均値を使用する必要があります。

高い発光活性の原因として、隣接するウェルからのオーバーフローがあります。これはクロストークを防ぐ高品質の不透明性プレートの使用により防ぐことができます。また、実験系を開始する前にルミノメーター自体や個々のウェルから放出する発光の測定能力を精査しておくことが重要です。各機器によって、クロストークの原因になりやすいインジェクションや発光検出のしくみが異なります。

Dual-Luciferase® Reporter Assay Systemについてご質問がある場合は、プロメガテクニカルサービス部までご連絡ください。

E-mail:
prometec@jp.promega.com

 5~10回のバックグラウンドを取り、その平均値を機械とサンプルチューブに起因するバックグラウンドの統計的に有意な値を得るために用いてください。

ウミシイタケルシフェラーゼ

ウミシイタケルシフェラーゼの活性測定におけるバックグラウンド発光には、次の3つの原因が考えられます。

1. 装置およびサンプルチューブによるバックグラウンド発光: ホタルルシフェラーゼの場合と同様です。
2. coelenterazine の自家発光: 溶液中の非酵素的な coelenterazine の酸化が原因です。自家発光の程度は溶液の組成によって異なりますが、PLB を用いて調製した溶解液の場合、一般に低い一定レベルの発光が得られます。特殊な組成のStop&Glo® Reagentは、自家発光を抑えるさらなる工夫が施されています。PLBおよびStop&Glo® Reagentの組成の影響下では、多くのルミノメーターで残存する自家発光を検出することはありません。
3. ホタルルシフェラーゼ反応の残光: Dual-Luciferase®測定では、ホタルルシフェラーゼアッセイの微量残光が原因となる可能性があります。しかし、ホタルルシフェラーゼ反応は 100,000分の1以下に消光されるため、ウミシイタケルシフェラーゼ発光反応の強度が最初のホタルルシフェラーゼ発光反応の1,000分の1以下にならなければ、このような残光が問題となることはありません。

上記の (1) および (2) に起因するバックグラウンド発光は一定であり、ウミシイタケルシフェラーゼの全測定値から差し引くことができます。(3) に起因するバックグラウンドは、ホタルルシフェラーゼの発現量によって変化するため、予想される最大のホタルルシフェラーゼ活性であってもウミシイタケルシフェラーゼの正確な測定に影響する強い残光は生じないことを確認しておく必要があります。このような状況は、Stop & Glo® ReagentとサンプルLAR II の混和が不十分な場合に生じることもあります。また、最初に注入したLAR II がチューブ壁面をコートして、次に注入した Stop & Glo® Reagentがコートした部分全体に行きわたらなかった場合、消光は不十分なものとなります。

装置、サンプルチューブ、およびcoelenterazineの自家発光に起因するバックグラウンドの測定は、次の手順にしたがって実施してください。

1. Passive Lysis Bufferを用いて、トランスフェクトしていないコントロール細胞の溶液を調製する。
2. 100µlのLuciferase Assay Reagent II を添加したルミノメーター用チューブに、20µlのコントロール細胞溶解液を添加する。
3. サンプルチューブに100µlの Stop & Glo® Reagentを添加する。
4. バックグラウンドを測定する。

ホタルルシフェラーゼの残光に起因するバックグラウンドの測定は、次の手順にしたがって実施してください。

1. Passive Lysis Bufferを用い、高レベルのホタルルシフェラーゼを発現している細胞の溶解液を調製する。
2. 100µlのLuciferase Assay Reagent II を添加したルミノメーター用チューブに、20µlの細胞溶解液を添加する。
3. ホタルルシフェラーゼの発光を測定する。
4. 100µlのStop & Glo® Reagentを添加する。
5. 見かけ上の発光を測定する。
6. coelenterazineの自家発光に起因するバックグラウンドと、装置に起因するバックグラウンド(上記で測定)を差し引く。

ホタルルシフェラーゼ反応がきわめて強い場合、バックグラウンドを差し引いた後の手順6の消光は、手順3で測定したホタルルシフェラーゼ発光の100,000分の1以下となる必要があります。ほとんどの場合、ホタルルシフェラーゼの発光値がバックグラウンド値単独の100,000倍を上回ることはありません。したがって、手順5で測定したバックグラウンドを上回るような強いホタルルシフェラーゼ残光シグナルを検出することはないと考えられます。

VII. 参考文献

1. Wood, K.V. et al. (1984) Synthesis of active firefly luciferase by in vitro translation of RNA obtained from adult lanterns. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **124**, 592-596.
2. de Wet, J.R. et al. (1985) Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 7870-7873.
3. Wood, K.V. (1991) In: *Bioluminescence and Chemiluminescence: Current Status*, eds. P. Stanley and L. Kricka, John Wiley and Sons, Chichester, 11.
4. Matthews, J.C. et al. (1977) Purification and properties of *Renilla reniformis* luciferase. *Biochemistry* **16**, 85-91.
5. Lorenz, W.W. et al. (1991) Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 4438-4442.
6. Farr, A. and Roman, A. (1992) A pitfall of using a second plasmid to determine transfection efficiency. *Nucl. Acids Res.* **20**, 920.
7. Sherf, B.A. et al. (1996) Dual-Luciferase[®] reporter assay: an advanced coreporter technology integrating firefly and *Renilla* luciferase assays. *Promega Notes* **57**, 2-9.

VIII. 付録

A. バッファーと溶液の組成

PBS Buffer, 10 × (1リットルあたり)

| | |
|-------|----------------------------------|
| 11.5g | Na ₂ HPO ₄ |
| 2g | KH ₂ PO ₄ |
| 80g | NaCl |
| 2g | KCl |

1 リットルの滅菌した脱イオン水に溶解。1 × PBSのpHは7.4。

B. 関連製品の紹介

ルシフェラーゼアッセイシステム、試薬

| 製品 | サイズ | カタログ番号 |
|--|--------------|--------|
| Dual-Luciferase® Reporter 1000 Assay System ^(a,b,c) | 1,000 assays | E1980 |
| Luciferase Assay System ^(a,c) | 100 assays | E1500 |
| | 1,000 assays | E1501 |
| RenillaLuciferase Assay System ^(c,f) | 100 assays | E2810 |
| | 1,000 assays | E2820 |
| Dual-Glo Luciferase Assay System ^(a,b,c,d) | 10ml | E2920 |
| | 100ml | E2940 |
| | 10 × 100ml | E2980 |
| QuantiLum® Recombinant Luciferase ^(e) | 1mg | E1701 |
| | 5mg | E1702 |
| Passive Lysis Buffer, 5X | 30ml | E1941 |

ルシフェラーゼレポーターベクター

| 製品 | サイズ | カタログ番号 |
|---|------|--------|
| phRL-null Vector ^(c,f,g,h) | 20µg | E6231 |
| phRL-TK Vector ^(c,f,g,h) | 20µg | E6241 |
| phRL-TK(Int3) Vector ^(c,f,g,h) | 20µg | E6251 |
| phRL-SV40 Vector ^(c,f,g,h) | 20µg | E6261 |
| phRL-CMV Vector ^(c,f,g,h,i) | 20µg | E6271 |
| phRG-B Vector ^(c,f,g,h) | 20µg | E6281 |
| phRG-TK Vector ^(c,f,g,h) | 20µg | E6291 |
| pRL-SV40 Vector ^(g) | 20µg | E2231 |
| pRL-TK Vector ^(g) | 20µg | E2241 |
| pRL-CMV Vector ^(g,i) | 20µg | E2261 |
| pRL-null Vector ^(g) | 20µg | E2271 |

コレポーターベクターであるphRLおよびpRLファミリーの新しいプロモーターの種類の販売についてのお問合せはプロメガテクニカルサービスまでご連絡ください。バルク包装の有無や個々のphRL,pRLベクターの価格についてもプロメガにご連絡ください。

ルミノメーター

| 製品 | サイズ | カタログ番号 |
|---|-----|--------|
| Turner Designs Model TD-20/20 Luminometer | | E2041 |
| Turner Designs Model TD-20/20 Luminometer with Printer | | E2051 |
| Turner Designs Model TD-20/20 Luminometer with Single Auto Injector | | E2351 |
| Turner Designs Model TD-20/20 Luminometer with Dual Auto Injector | | E2361 |
| Turner Designs Model TD-20/20 Luminometer with Printer and Dual Auto Injector | | E2061 |

(a)U.S. Pat. Nos. 5,283,179, 5,641,641, 5,650,289 and 5,814,471, Australian Pat. No. 649289, European Pat. No. 0 553 234 and Japanese Pat. No. 3171595 have been issued to Promega Corporation for a beetle luciferase assay method, which affords greater light output with improved kinetics as compared to the conventional assay. Other patents are pending.

(b)U.S. Pat. No. 5,744,320 and Australian Pat. No. 721172 have been issued to Promega Corporation for quenching reagents and assays for enzymemediated luminescence. Other patents are pending.

(c)Certain applications of this product may require licenses from others.

(d)U.S. Pat. No. 5,670,356 has been issued to Promega Corporation for a modified luciferase technology.

(e)The method of recombinant expression of Coleopteraluciferase is covered under U.S. Pat. Nos. 5,583,024, 5,674,713 and 5,700,673.

(f)Patent Pending.

(g)Licensed under U.S. Pat. Nos. 5,292,658 and 5,418,155 and other patents.

(h)For Nonprofit Organization research use only. Specifically, researchers at Nonprofit Organizations may use this product in their research and they may transfer derivatives of the product to colleagues at other Nonprofit Organizations provided that such colleagues agree in writing to be bound by the terms and conditions of this label license. Researchers may not transfer this product or its derivatives to researchers at other organizations, which are not Nonprofit Organizations, without the express written consent of Promega and without those entities having an express license from Promega for the use of the product. Other than as specifically provided here, an authorized transferee of this product shall have no right to transfer this product or its derivatives to any other person or entity. A Nonprofit Organization performing research using this product for a for-profit organization also shall be considered for-profit. For-profit entities purchasing this product shall have six (6) months to evaluate the product in their research.

Thereafter, such for-profit entities shall either contact Promega Corporation and take a license for their continued use of the product or destroy the product and all derivatives thereof. With respect to any therapeutic or diagnostic uses by any entity, please contact Promega Corporation for supply and licensing information.

(i)The CMV promoter and its use are covered under U.S. Pat. Nos. 5,168,062 and 5,385,839 owned by the University of Iowa Research Foundation, Iowa City, Iowa, and licensed FOR RESEARCH USE ONLY. Commercial users must obtain a license to these patents directly from the University of Iowa Research Foundation.

© 1996-2001, 2003 Promega Corporation. All Rights Reserved.

Dual-Luciferase, QuantiLum and Stop & Glo are trademarks of Promega Corporation and are registered with the U.S. Patent and Trademark Office.

DLR and Dual-Glo are trademarks of Promega Corporation.

Teflon is a registered trademark of E.I. duPont de Nemours and Company. Triton is a registered trademark of Union Carbide Chemicals and Plastics

Technology Corporation. Tygon is a registered trademark of Norton Performance Plastics Corporation.

All prices and specifications are subject to change without prior notice.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.

Dual-Luciferase® Reporter Assay System: 簡易プロトコール

この簡易プロトコールは、Dual-Luciferase® Reporter Assay Systemに習熟したユーザーが簡単に流れを追えるように意図して作成されました。初めてDual-Luciferase® Reporter Assay Systemをお使いになるときには、詳細なプロトコールにしたがってください(セクションV.A からセクション VI.C)。

| | |
|--|--|
| <p>実験を始める前に</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. 適切なウミシイタケルシフェラーゼコントロールコレポーターベクターを選択する (セクションIII)。 2. セクション V.A、VI.A、およびVI.Bで指示されているように試薬を調製する。簡単に、 <ol style="list-style-type: none"> a. 5 × Passive Lysis Buffer 1につき、4倍量の蒸留水を添加。よく混合する。 b. 10ml の供給されたLuciferase Assay Buffer II を、凍結乾燥したLuciferase Assay Substrate に加える。混合して溶かす。 c. 1 × Stop & Glo® Reagentを調製するために、適量の50 × Stop & Glo® Substrateをガラスまたはシリコンコートしたポリプロピレンチューブに入れた50倍量のStop & Glo® Bufferに添加する。例えば、20µlのStop & Glo® Substrateを、1mlのStop & Glo® Bufferに添加し、10回のアッセイに十分なStop & Glo® Reagentを調製する。 |
| <p>細胞の受動的または能動的溶解 (セクションV.B および V.C)</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. 培養細胞から増殖倍地を除き、穏やかにPBSを加え、培養容器の表面を洗浄する。容器を静かに旋回させる。すすいだ溶液を完全に除去する。 2. 各培養容器に推奨された最少量の1 × PBSを分注する。受動的および能動的溶解に推奨する容量についてはそれぞれセクションV.B および V.C を参照。 3. 受動的溶解：培養プレートに回転式プラットフォームまたは回転式シェーカーに置き、振とうし、細胞の単層が1 × PLBで完全かつ均等に覆われるようにする。25 で15分間振とうする。ライセートをチューブまたはバイアルに移す。 能動的溶解：1 × PLBを添加後、すぐに使い捨てのプラスチックセルリフターあるいはラバーポリスマンで激しく掻き取り、細胞を回収する。プレートを傾け、ライセートを低い側に掻き落とす。集めたライセートを数回ピペティングする。細胞ライセートを1、2回凍結融解し、細胞を完全に溶解する。 |
| <p>インジェクター付きでない、またはシングルインジェクター付きルミノメーターを使用する場合のプロトコール (セクション VI.C)</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. 100µlのLAR II をルミノメーター用チューブに予め分注する。 2. ルミノメーターを、各レポーターアッセイ当たり2秒間の待機後に10秒間測定するように設定する。 3. LAR II を添加したルミノメーター用チューブに最大20µlの細胞溶解液を注意しながら移し、2~3回ピペティングして混和する。チューブをルミノメーターに設置する。読み込みを開始する。ホタルルシフェラーゼ活性測定値を記録する。 4. 100µlのStop & Glo® Reagentを分注する。インジェクター付きでないルミノメーターを使用する場合は、ルミノメーターからサンプルチューブを取り出して100µlのStop & Glo® Reagentを添加し、軽くボルテックスして混和する。サンプルをルミノメーターに戻し、読み込みを開始する。ウミシイタケルシフェラーゼ活性測定値を記録する。 5. 反応チューブを廃棄し、次のDLR™ Assayに移る。 |