

2016年 春号

Promega

KAWARABAN

かわらばん

プロメガは
発光テクノロジーで
創薬、がん研究を
サポートします。

- 二頁、NanoLuc[®] ルシフェラーゼについて
- 三頁、最新の qPCR 解析ツール：
センサーからレポーターアッセイまで
- 四頁、驚きの再現性：
発光レポーターを利用した ADCC アッセイ
- 五頁、マルチプレックス解析：
同一細胞サンプルを用いた細胞生存性試験と
遺伝子発現解析
- 六頁、お客様の声：今話題の ccfDNA 精製
- 七頁、ちよいテク..
吸引法のススメ (プラスミド・PCR 産物精製)

NanoLuc® ルシフェラーゼってすごい

ルシフェラーゼは感度の高さからレポーター酵素で最も汎用されるようになりました。プロメガではさらに研究に有効なツールとしてより高輝度で、分子量も小さい NanoLuc® を開発しました。NanoLuc® は深海エビ (*Oplophorus gracilirostris*) 由来のルシフェラーゼで、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 100 倍以上明るく、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。100 倍の明るさは 1/100 の分子数のレポーター酵素でも十分に検出でき、分子量の小ささは標的タンパク質と融合させる場合においてもその機能への影響が最小限に抑えられることを意味します。これらの特長は細胞内で起こる現象をよりありのままに、細胞・タンパク質機能への影響を最小限に抑えた実験ツールとしての可能性を秘めています。今回は活用例として、タンパク質間相互作用 (PPI) へ応用した NanoBiT® システム、および分泌型 NanoLuc® についてご紹介します。

NanoBiT® : NanoLuc® 2 分子テクノロジー

PPI は細胞内のシグナル伝達ネットワークの必須要素です。セルフリーで PPI をモニタリングする方法は数多くありますが *in vivo* の状況を必ずしも反映しているとは言えません。細胞を用いた従来の検出法では細胞を溶解することなく、また特殊な装置を使わずに定量性のある検出をすることは容易ではありませんでした。プロメガは NanoLuc® ルシフェラーゼをベースにした、2つのサブユニットシステムで生細胞内での PPI 検出を可能にする NanoLuc® 2 分子テクノロジー (NanoBiT: NanoLuc® Binary Technology) を開発しました。Large BiT (LgBiT; 18 kDa) および Small BiT (SmBiT; 11 アミノ酸ペプチド) のサブユニットをそれぞれ標的タンパク質との融合体として発現させ、PPI が起こるとサブユニットの相補性が促進され発光酵素として明るい光を生じます (図 1)。多くのスプリット系とは対照的に LgBiT:SmBiT の相互作用は可逆的でタンパク質間の迅速な解離も検出することができます。

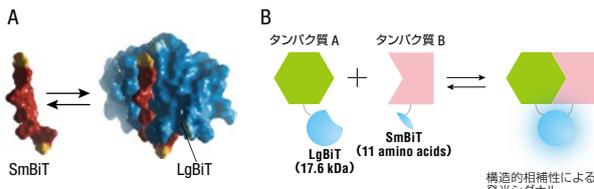


図 1. NanoBiT® の構造と再構成によるタンパク質間相互作用の測定原理

A: NanoBiT® を構成する Large BiT と Small BiT の構造。B: タンパク質 A と B にそれぞれ Large BiT と Small BiT を融合させて細胞内で発現させ、タンパク質 A と B が相互作用すると NanoBiT® が再構成されて発光を示す。

実験例として、ラパマイシン依存的に結合することが知られている 2 つのタンパク質 FKBP と FRB の相互作用を測定しました。NanoBiT® および従来型のホタルルシフェラーゼのスプリットの各サブユニットに FKBP および FRB を融合し、細胞内でラパマイシンの刺激に応答する相互作用の強さを発光測定しました。その結果、スプリットホタルルシフェラーゼに比べ、NanoBiT® の発光値はより広いレンジで結合の強さを示しました (図 2A)。ラパマイシン存在下、FKBP - FRB 結合に対する FK506 の効果をモニタリングしました (図 2B)。NanoBiT® はスプリットルシフェラーゼに比べ速やかなシグナルの低下が観察されました。このように、NanoBiT® は 2 分子の結合および分離を可逆的にかつ速やかにモニタリングできます。同じ実験はコントロールベクターセット (Cat# N2016) と検出試薬 (Cat# N2011) を用いて実施することができます。

さらに、NanoBiT® は Small BiT の 11 アミノ酸というサイズにより、融合タンパク質への活性への影響を最小限にするだけでなく、タンパク質-ペプチドの相互作用や、タンパク質や抗体用のタグとしての利用など、様々な応用アプリケーションへの可能性が秘められています。

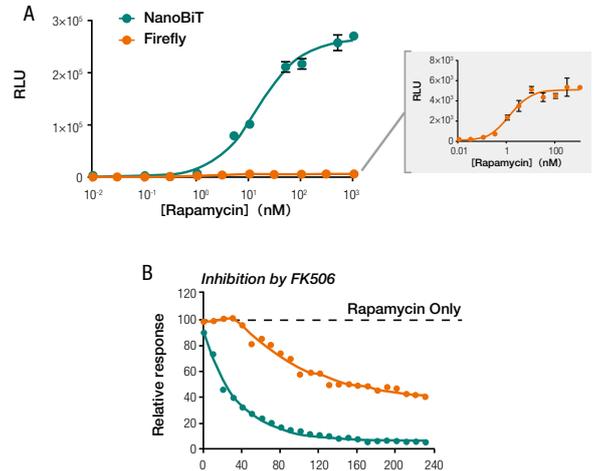


図 2. FRB:FKBP 相互作用の概要と NanoBiT® とスプリットルシフェラーゼの比較

A: NanoBiT® またはスプリットルシフェラーゼを細胞内で発現させ、ラパマイシン濃度依存的な相互作用の強さを定量した。B: FKBP と FRB の結合を阻害する FK506 をラパマイシン存在下で添加し、添加後 (t=0) の時間と発光値の関係を示した。

分泌型 NanoLuc®

プロメガでは NanoLuc® を使用する実験の多様性を広げるため、分泌型 NanoLuc® (secNluc) もご用意しております。NanoLuc® の N 末端に分泌シグナルとして IL-6 シグナルペプチドを付加することにより、細胞外に NanoLuc® を分泌させます。secNluc は細胞外に分泌されるため、培地をサンプリングすることにより、細胞を溶解することなく、NanoLuc® の発光を測定することができます (図 3)。

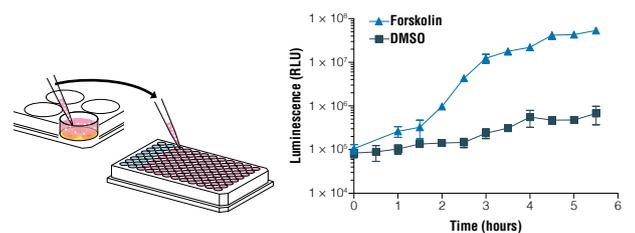


図 3. 培養上清を用いた分泌 NanoLuc® アッセイ

NanoLuc® ルシフェラーゼ (secNluc) の CRE 応答性発現を 6 時間フォルスコリン誘導あるいは DMSO コントロールの細胞で測定した。培地交換を t=0 で行った。分泌アッセイフォーマットによりレポーターの活性化カインेटクスを細胞溶解することなく測定できた。

関連製品

	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
NanoBiT® システム			
スターターキット (クローニングベクター、コントロール、検出試薬)			
NanoBiT® PPI MCS Starter System	1 システム	N2014	180,000
NanoBiT® PPI Flexi® Starter System	1 システム	N2015	180,000
コントロールベクターセット			
NanoBiT® PPI Control Pair (FKBP, FRB)	1 セット	N2016	75,000
検出試薬			
	100 回分	N2011	28,000
Nano-Glo® Live Cell Assay System	1,000 回分	N2012	180,000
	10,000 回分	N2013	1,530,000

	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
NanoLuc® レポーターベクター			
分泌型 NanoLuc® レポーターベクター			
pNL1.3 [secNluc] Vector	20 µg	N1021	73,000
pNL3.3 [secNluc/minP] Vector	20 µg	N1051	73,000
pNL2.3 [secNluc/Hygro] Vector	20 µg	N1081	73,000
pNL1.3.CMV [secNluc/CMV] Vector	20 µg	N1101	73,000

◎ キャンペーン対象製品: 詳細については 8 ページをご覧ください。

今すぐ始めたいけど装置が無い? そんな時は...
www.promega.co.jp/rentamax/

最新の GPCR 解析ツール：センサーからレポーターアッセイまで

創薬における重要な過程に、*in vitro* での活性評価があげられます。薬効薬理と異なり、多くの化合物を評価する必要性から、評価系は偽陽性・偽陰性が少なく、かつ簡便で定量性があることが求められます。プロメガは独自のバイオルミネッセンスを主軸の技術として、創薬に最適なアッセイ系を構築しています。今回は、G たんぱく質共役型受容体 (GPCR) を標的としたツールをご紹介します。GPCR は、作用薬アゴニストの結合を引き金として細胞にさまざまな変化をもたらします。これらの変化をライブセルで検出できるユニークなアッセイ系を紹介합니다。

cAMP センサーを内蔵したルシフェラーゼ **GloSensor™ cAMP** を細胞内に導入することにより、細胞内の cAMP 濃度のカインेटクスを観察することができます (図 1)。cAMP の測定は一般的に競合法で測定することが多く、通常 cAMP 増加に合わせてシグナルが低下しますが、本系はシグナルが増加する点と細胞数の至適化の必要が無い点が大きな特徴です。また、cAMP 増加にともなう **PKA の活性化**、すなわち PKA 触媒ドメイン (CA) から調節ドメイン (R2A) の解離をタンパク質間相互作用検出ツール NanoBiT® あるいは NanoBRET™ で測定することができます (図 2, 3)

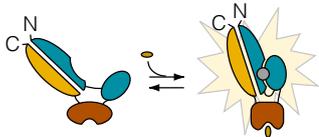


図 1. GloSensor™ cAMP の反応模式図

ルシフェラーゼに組み込まれた cAMP 結合ドメインに cAMP が結合することにより、構造が変化してルシフェラーゼ活性を獲得する。

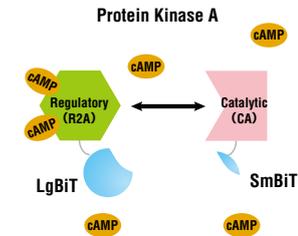


図 2. NanoBiT® による PKA 活性化の反応模式図

PKA 触媒ドメイン (CA)-SmBiT およびタイプ 2 調節ドメイン (R2A)-LgBiT は複合体を形成しており、細胞内 cAMP の増加に伴い R2A が解離し、NanoBiT® も 2 つに分かれて発光する。

(※ このアッセイ系は、NanoBiT® PPI Starter System のコントロールアッセイとして付属しています)。

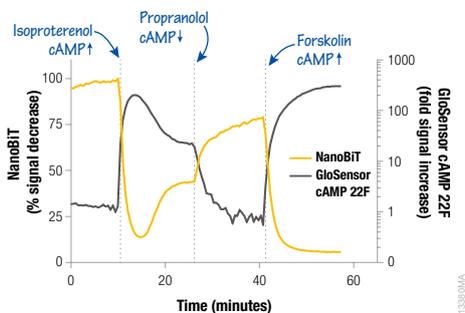


図 3. cAMP 濃度変化のダイナミクスをモニタリングできる 2 種類のバイオセンサー

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

多くの GPCR のシグナル伝達は共役する G α サブユニットにより異なりますが、β-アレスチンの GPCR への結合は、G α サブユニットに依存しない系として知られています。プロメガでは、NanoBRET™ および NanoBiT® (図 4) を用いて、β-アレスチンの結合実験系を構築しました。

この系ではカインेटクスを取ることで、タイプ A 受容体とタイプ B 受容体では、異なった様式を示しました。

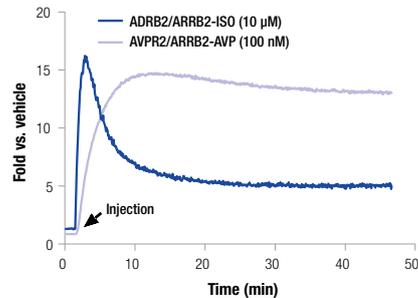


図 4. NanoBiT® による GPCR : β-アレスチンの相互作用モニタリング

β 2-アドレナリン作用性受容体 (ADRB2) およびアルギニンバソプレシリン受容体 (AVPR2) に対する β-アレスチン 2 (ARRB2) の結合を NanoBiT® で観察した。ADRB2 アゴニストであるイソプロテレンール (ISO) および AVPR2 アゴニスト Arg8-バソプレシリン (AVP) でそれぞれを刺激前後の発光量を vehicle に対する比としてあらわした。(ACS Chem. Biol., 2015, DOI: 10.1021/acschembio.5b00753)

このほか、BRET を用いた GPCR の二量体化およびインターナリゼーション、細胞内 Ca 測定、エンドポイントでの cAMP の定量、応答配列によるレポーターアッセイなどがバイオルミネッセンスを用いて測定することができます (図 5)。特にレポーターアッセイでは、最新の NanoLuc® を用いたアッセイ系も可能になっています。

GPCR ではすべてセルベースアッセイをご紹介しましたが、セルフリーで行う多くの酵素アッセイ系もサポートしています。しかもすべて、混ぜるだけのホモジニアスアッセイです。

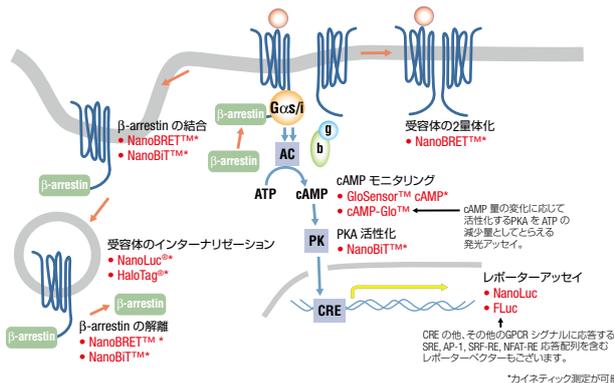


図 5. GPCR 研究を加速させる様々な発光アッセイツール

プロメガでは様々なセンサー、レポーターを用いたセルベースの GPCR 研究ツールを揃えています。

関連製品

	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
センサー			
センサー発現ベクター			
pGloSensor™ -22F cAMP Plasmid	20 μg	E2301	114,000 (特)
pGloSensor™ -20F cAMP Plasmid	20 μg	E1171	114,000
検出試薬			
GloSensor™ cAMP Reagent	25 mg	E1290	57,000 (特)
	250 mg	E1291	260,000
タンパク質間相互作用			
NanoBiT® スターターキット			
NanoBiT® PPI MCS Starter System	1 キット	N2014	180,000
NanoBiT® PPI Flexi® System	1 キット	N2015	180,000 (特)

	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
NanoBRET™ スターターキット			
NanoBRET™ PPI MCS Starter System	1 キット	N1811	180,000 (特)
NanoBRET™ PPI Flexi® Starter System	1 キット	N1821	150,000 (特)
NanoBRET™ Nano-Glo® Detection System	1,000 回分	N1662	200,000 (特)
<small>NanoBRET® に関しては、ベクター構築のお手伝いも行っています。</small>			
レポーターベクター			
NanoLuc® シグナル応答ベクター			
pNL [NlucP/CRE/Hygro] Vector	20 μg	非カタログ品	78,000 (特)
pNL [NlucP/SRE/Hygro] Vector	20 μg	非カタログ品	78,000 (特)
pNL [NlucP/AP1-RE/Hygro] Vector	20 μg	非カタログ品	78,000 (特)
pNL [NlucP/NFAT-RE/Hygro] Vector	20 μg	非カタログ品	78,000 (特)
pNL [NlucP/SRF/Hygro] Vector	20 μg	非カタログ品	78,000 (特)

◎ キャンペーン対象製品：詳細については 8 ページをご覧ください。

驚きの再現性：発光レポーターを利用した ADCC アッセイ

抗体医薬に代表されるバイオ医薬品の研究開発が加速しています。バイオ医薬品の一般化を後押しすると期待されているバイオシミラーの開発も活発化しています。「同程度の薬効を示す=バイオシミラー」だけでなく「よりよい効果を持つ=バイオベター」という考え方も出てきており、開発研究から製造、品質管理まで、新たな技術が求められていることは間違いありません。

このセクションでは、抗体医薬の研究・評価試験のうち従来法の問題を新たな技術で克服したアッセイや、従来法では対応できなかった新しいニーズに応えるアッセイをシリーズでご紹介します。

第一回目は抗体医薬の主要な作用機序の一つ、Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) アッセイを取り上げます。従来の ADCC アッセイは ①初代 NK 細胞 (PBMC など) をエフェクター細胞として使用し、②エフェクター細胞が惹起したターゲット細胞死を検出していました。

しかし、バックグラウンドが高いため十分な検出感度が得られず、初代 NK 細胞の活性が不安定であるため再現性が低い、という問題がありました。その上作業が煩雑で時間がかかるため開発研究においても使いづらいアッセイでしたが、さらに厳密さが要求される品質管理試験のクライテリアを満たすことは極めて難しいものでした。

この問題を克服するため、プロメガではレポーターアッセイを応用した **ADCC Reporter Bioassay** を開発しました。ADCC では、抗体によるエフェクター細胞活性化の際に NFAT シグナル経路が活性化されることがターゲット細胞死につながるトリガーであることが報告されています。この NFAT シグナル経路活性化をレポーターで検出することにより、従来のようにターゲット細胞死を検出する方法に比べてバックグラウンドが大幅に低くなり、検出感度が格段に向上しました (図 1)。またエフェクター細胞として組換え Jurkat 細胞を使うことにより、NK 細胞の不安定さに起因する問題を克服し、品質管理試験に使用できる高い再現性と信頼性を実現しました (図 2)。

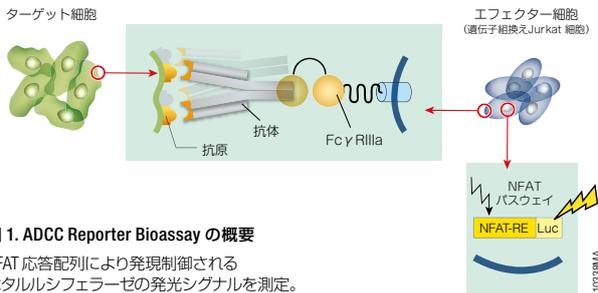


図 1. ADCC Reporter Bioassay の概要

NFAT 応答配列により発現制御されるホタルルシフェラーゼの発光シグナルを測定。

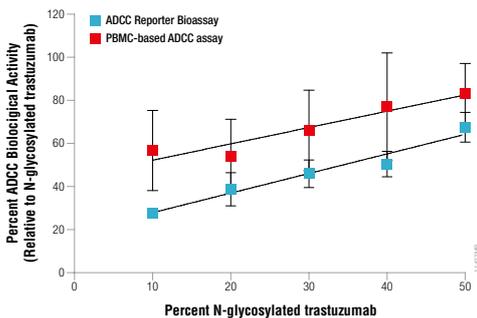


図 2. 抗体グリコシル化にともなう ADCC 活性の従来法との比較

従来法 (■) に比べ、レポーター法 (■) のエラーバーは非常に小さい

アッセイプロトコールにも工夫を凝らしています。細胞培養が不要な Thaw-and-Use フォーマットを採用し、細胞を試薬のように使うことができます。このため従来 1 週間以上かかっていたアッセイを、たった 1 日で終えることができます (図 3)。

関連製品

	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
ADCC レポーターアッセイ			
コンプリートキット			
ADCC Reporter Bioassay, Complete (WIL2-S)	1 キット	G7014	138,000
ADCC Reporter Bioassay, Complete (Raji)	1 キット	G7015	138,000
コアキット			
ADCC Reporter Bioassay, Core Kit	1 キット	G7010	115,000
	5 キット	G7018	515,000

⑤ キャンペーン対象製品：詳細については 8 ページをご覧ください。

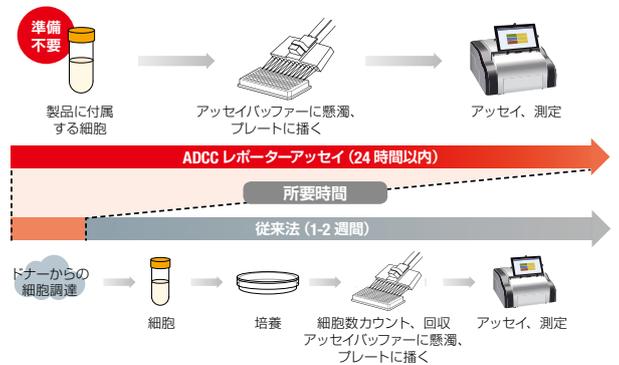


図 3. 飛躍的に短縮されたプロトコル

ADCC Reporter Bioassay のメリットはこれだけではありません。ADCC において、抗体はエフェクター細胞表面の Fc γ R1a 受容体と結合しますが、この受容体には抗体と親和性の高い **V variant** と親和性の低い **F variant** があり、F variant は ADCC が起きにくい事が報告されています。従来法では親和性の高い V variant でなければ十分な差が見られなかったため、V variant をホモで持つドナーからの細胞を使用していましたが、実際は約 85% の人が F variant をヘテロまたはホモで持つと報告されており、V variant の調達が困難でした。そのため、多くの患者様での効き目を評価できない点が問題となっていました。ADCC Reporter Bioassay では Jurkat 細胞に外来性 Fc γ R1a 受容体を導入しているため、V variant または F variant を単独で発現するエフェクター細胞を容易に作る事ができます。また感度が高いため、抗体への応答性が低い F variant でも十分なシグナルが得られ、効果判定ができるようになったのです (図 4)。

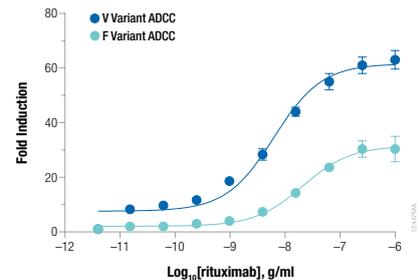


図 4. V variant と F variant の応答性比較

今回紹介した ADCC アッセイの他にも、プロメガでは抗体医薬品開発をサポートする画期的な製品を次々に開発しています。次回は免疫チェックポイントでホットな抗 **PD-1 / PD-L1 抗体** のアッセイをご紹介します。お楽しみに！

ADCC レポーターバイオアッセイについては次ページをご覧ください。

※コンプリートキットはエフェクター細胞(組換え Jurkat 細胞[Fc γ R1a-V158 バリエーション、luc2])、ターゲット細胞 (WIL2-S または Raji)、コントロール抗体 (Anti-CD20)、アッセイ試薬などが付属します。
 ※コアキットにはコンプリートキットに含まれるターゲット細胞およびコントロール抗体が除かれています。
 ※この他のエフェクター細胞として、Fc γ R1a-F158 バリエーション、マウス Fc γ RIV、マウス Fc γ RIII などをご用意しております。詳細については弊社までお問合せください。

今すぐ始めたいけど装置が無い? そんな時は...
www.promega.co.jp/rentamax/

ADCP もレポーターバイオアッセイ

最近 ADCC と並んで、ADCP という言葉を見たまたは聞いたことがあるのではないのでしょうか？ ADCP とはどのような現象でしょうか？ また ADCC と何が違うのでしょうか？

ADCC (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) の主役は NK 細胞です。活性化した NK 細胞は液性成分を分泌してターゲット細胞を殺します。一方、ADCP (Antibody-dependent cell-mediated phagocytosis) の主役はマクロファージです。活性化したマクロファージはターゲット細胞を貪食することで排除します (図 5)。ADCP ではエフェクター細胞の種類のほか、関係する Fc γ 受容体の種類も違います。ADCC ではタイプ III 受容体 (Fc γ RIIIa) を介してエフェクター細胞が活性化しますが、ADCP ではタイプ II 受容体 (Fc γ RIIa) を介するため、ADCC アッセイ用の細胞では ADCP アッセイができません。ADCP アッセイのニーズが高まったことを受け、この度プロメガでは ADCP Reporter Bioassay を発売しました。タイプ II 受容体にも高親和性の H variant と低親和性の R variant があることが分かっており、プロメガでは両方のアッセイキットをご用意しています。R variant キットはまだカスタム品ですが、将来的にカタログ品化する予定です。

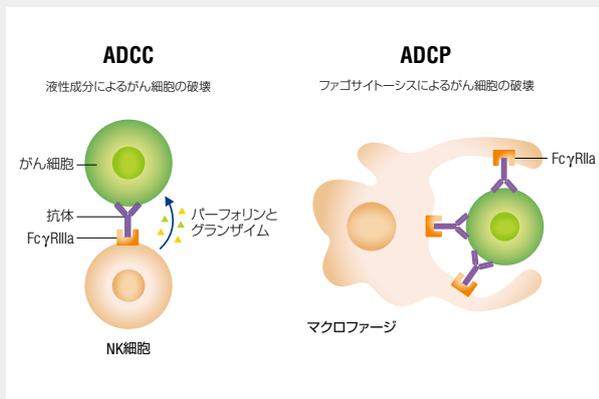


図 5. ADCC と ADCP の作用機序比較

ADCC および ADCP バイオアッセイ

バイオアッセイ	システムに含まれる細胞	カタログ番号
ADCC Reporter Bioassays		
Complete Kit (WIL2-S) ¹		G7014
Complete Kit (Raji)	Effector Cells: Fc γ RIIIa-V158 Jurkat cells	G7015
Core Kit2.	Target Cells: WIL2S or Raji cells	G7010
ADCC Reporter Bioassays, F Variant5		
Core Kit	Effector Cells: Fc γ RIIIa-F158 Jurkat cells	G9790
mFcγRIV ADCC Reporter Bioassays		
Complete Kit	Effector Cells: Mouse Fc γ RIV Jurkat cells	カスタム品
mFcγRIII ADCC Reporter Bioassays		
Core Kit	Effector Cells: Mouse Fc γ RIII Jurkat cells	カスタム品
FcγRIIIa-H ADCP Reporter Bioassays 新発売!		
Complete Kit		G9901
Core Kit	Effector Cells: Fc γ RIIIa-H131 Jurkat cells	G9991
FcγRIIIa-R ADCP Reporter Bioassays		
Core Kit	Effector Cells: Fc γ RIIIa-R131 Jurkat cells	カスタム品
FcγRI ADCP Reporter Bioassays		
Core Kit	Effector Cells: Fc γ RI Jurkat cells	カスタム品

※カスタム品については弊社テクニカルサービス部までお問合せください。

マルチプレックス解析： 同一細胞サンプルを用いた細胞生存性試験と遺伝子発現解析

培養細胞を用いた実験が日常化している現在、より生体に近い高次元細胞モデルである 3 次元培養細胞あるいは初代培養細胞、ES/iPS 分化細胞など特殊かつ貴重な細胞が多く利用されてきています。プロメガでは、これらに対応すべく高次元細胞プロジェクトとして、3 次元培養対応、カイネティクス測定、多重測定（マルチプレックスアッセイ）あるいは、細胞内エネルギー代謝測定システムなど、より高度なツールを提供しています。今回は、マルチプレックスアッセイの中でも、特にユニークな例をご紹介します。

細胞生存性測定と RNA 精製あるいはレポーターアッセイとのマルチプレックス解析



細胞の継続的な生存性を測定するために、細胞非侵襲的な方法として RealTime-Glo™ が開発されました。この非侵襲的な特徴を生かして、細胞生存性測定後に細胞を他の目的に利用することが可能です。薬剤による細胞刺激、siRNA などによるノックダウンの影響の指標として、細胞生存性試験あるいは発現量（転写量）の変化を測定します。RealTime-Glo™ は両試験を同一細胞で測定することを可能にしました。

これを確認するために RealTime-Glo™ の RNA 精製に対する影響を調べたところ、その収量に影響が認められず（図 1）、また、ホタルルシフェラーゼによるレポーターアッセイに対する影響も認められませんでした（図 2）。

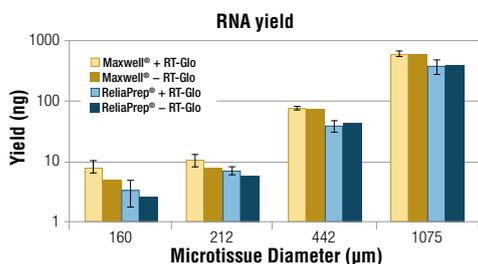


図 1. Maxwell®（自動精製）あるいは Reliaprep™（マニュアル精製）による RNA 精製に対する RealTime-Glo™ の影響

さまざまなサイズの HEK293 スフェロイドを RealTime-Glo™ を用いて細胞生存性を測定した後、Maxwell® 16 LEV simply RNA Tissue Kit あるいは Reliaprep™ RNA Tissue Miniprep System を用いて RNA 精製を行った。RealTime-Glo™ は、RNA の収量に影響を与えなかった。

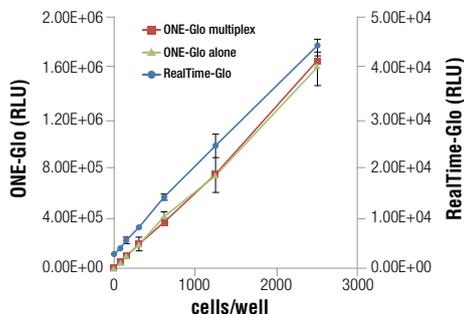


図 2. ホタルルシフェラーゼアッセイに対する RealTime-Glo™ の影響

RealTime-Glo™ 試薬添加 2 時間後に細胞生存性を測定し、次にルシフェラーゼアッセイ試薬である ONE Glo™ を添加して、ルシフェラーゼ活性を測定した。レポーターアッセイの結果、RealTime-Glo™ 非処理（▲）と比較し RealTime-Glo™ 処理（■）による影響は認められなかった。

次に細胞周期をコントロールする CDK2 に対する siRNA をトランスフェクションし、同一細胞を用いて細胞生存性および転写産物を定量しました。CDK2 siRNA をトランスフェクションすると、継続的な細胞生存性の低下が認められ、併せて細胞内の転写量が低下していることも確認することができました（図 3）。この結果は CDK2 のノックダウンにより細胞周期が停止し、細胞数が減少したことを示唆していました。

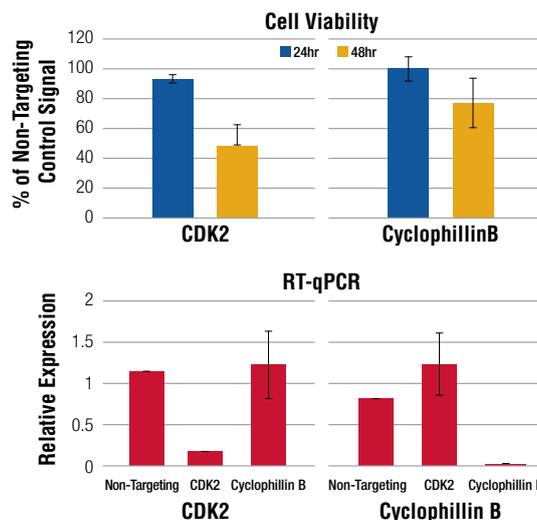


図 3. siRNA 処理による細胞生存性試験と遺伝子発現解析のマルチアッセイ

CDK2 およびハウスキープ遺伝子 Cyclophilin B に対する siRNA 処理後 24 時間および 48 時間に RealTime-Glo™ による細胞生存性試験を行った。さらに、同一の細胞サンプルより抽出した RNA と GoTaq® 1-Step RT-qPCR System を用いて RT-qPCR を行い各遺伝子の転写物を定量した（コントロール：GAPDH）。CDK2 のノックダウンは細胞生存性を低下させたが、Cyclophilin B では顕著な影響は認められなかった。

RealTime-Glo™ については、このほかに ATP 測定による細胞生存性試験 CellTiter-Glo®、アポトーシス試験 Caspase-Glo® 3/7 などを組み合わせたマルチプレックスアッセイが可能で、その他 Promega の多くのアッセイシステムでもマルチプレックスアッセイが構築されています。詳細については弊社 Web サイトを参照いただくか直接お問い合わせください。

今すぐ始めたいけど装置が無い？そんな時は...
www.promega.co.jp/rentamax/

関連製品

	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
セルベースアッセイ			
細胞生存性試験 (リアルタイム)			
	100 回分	G9711	20,000
RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay	10 × 100 回分	G9712	97,000
	1000 回分	G9713	88,000
ホタルルシフェラーゼアッセイ			
ONE-Glo™ Luciferase Assay System	10 ml	E6110	22,000
	100 ml	E6120	139,000
核酸精製			
RNA 自動精製			
Maxwell® RSC System	1 台	AS4500	2,800,000
Maxwell® RSC simplyRNA Tissue	48 回分	AS1340	39,000
RNA マニュアル精製			
Reliaprep™ RNA Tissue Miniprep System	50 回分	Z6111	34,000
	250 回分	Z6112	152,000
RT-qPCR			
GoTaq® 1-Step RT-qPCR System	200 回分	A6020	75,000

◎ キャンペーン対象製品：詳細については 8 ページをご覧ください。

◎ プロメガクラブ対象製品です。会員価格については www.promega.co.jp/promegaclub.html でご確認ください。



日本医科大学 消化器外科
山田 岳史 先生

イントロダクション:

近年、がんのバイオマーカーとして ccfDNA が大注目されています。

今回で登場いただく日本医科大学 消化器外科 山田岳史先生の研究室では、ccfDNA の解析により、主に大腸がんを対象とした有効な治療法の研究が行われています。先生の研究室では、ccfDNA 精製に、Maxwell® RSC Instrument (自動精製装置) と Maxwell® RSC ccfDNA Plasma Kit をいち早く採用いただき、日々の研究にご利用いただいております。Maxwell® RSC Instrument とその ccfDNA Plasma Kit を採用したその理由をお客様の視点から語っていただきました。

先生のお悩みごと

ccfDNA を抽出するために、手術を受けた患者さんは 3 ヶ月に 1 回、化学療法中の患者さんは 2 ヶ月 1 回の頻度で採血しています。検体があつたという間にたまってしまいうので、これらの検体から ccfDNA を精製する時間の確保が大変で、若手のドクターが ccfDNA 抽出のため、休日出勤することもありました。

問題点

- 臨床ドクターには自由になる時間が少ない
- 毎年、新人が入ってきて教えるのがたいへん
- 実験に慣れない者が多いので、サンプル間のバラつきが心配
また、取り違え・コンタミのリスクが心配

Maxwell® RSC 導入後のお喜びの声

- ① それまで使っていたマニュアル操作のキットより 20 分長くかかりますが、実際に手を動かす時間は短いので、手離れがよく、臨床ドクターにとっては非常にありがたい
- ② 外来診療や回診の前にセットして、帰ってきたら終わっている
- ③ 手動のキットとは異なり、あまり経験を積まなくても、再現性良く精製できるので安心

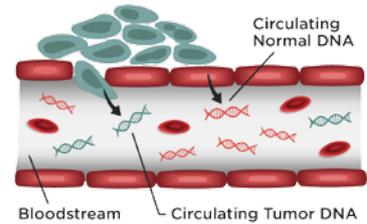
改善点

- 血漿 1 ml をカートリッジに加えて、75 分待つだけ。診療の合間に 1 ラン完了
- シンプルな操作のため、一度教えるだけで誰でも操作を習得
- 機器による全自動精製のため、サンプル間・オペレーター間のバラつきがない
- 試薬をプレパック済みの精製用カートリッジ、ディスポのチップ類を採用しており、コンタミやサンプルのロスの心配がない

ccfDNA はがんの診断、分子標的治療薬の効果予測・耐性予測に有用なバイオマーカーと考えられていますが、術後のサーベイランスや分子治療薬以外の化学療法におけるバイオマーカーとしての利用も期待されています。KRAS の変異は EGFR 阻害剤の薬効に大きな影響を及ぼします。大腸癌では原発巣において KRAS が野生型であっても、転移巣では約 10% で変異型となっているそうです。ccfDNA を用いることで転移巣での KRAS 変異の有無を知ることが可能となりますが、ccfDNA から KRAS 変異が検出される症例では EGFR 阻害剤の効果はあまり期待できません。また EGFR 阻害剤に耐性化した症例では ccfDNA から KRAS 変異が検出されます。

通常、ccfDNA は血漿サンプルから精製されますが、より低侵襲なことから尿サンプルも注目されています。先生の研究室では、尿サンプルを ccfDNA の研究に利用する計画が倫理委員会にて認可され、こちら Maxwell® RSC Instrument を使って ccfDNA の精製にトライされるそうです。大注目の ccfDNA 研究において、また新しい知見が得られると思います。

Maxwell® RSC Instrument は、1 回のランで最大 16 サンプルを同時処理する自動核酸精製装置で、精製用の試薬をプレパックしたカートリッジにサンプルを加え、装置にセットするだけです。ccfDNA 精製キット以外にも miRNA 精製キット、FFPE からの DNA 精製キット、組織・細胞からの total RNA を抽出するキットも取り揃え、精製した ccfDNA は、デジタル PCR、NGS による網羅的変異解析、Pyrosequence によるメチレーション解析にも利用されています。



癌細胞に由来する ccfDNA は低侵襲性バイオマーカーとして期待が集まっています!

3 ステップ
(Maxwell® 法)

カートリッジを
セット

血漿を添加

スタートボタンを
押す



Maxwell® RSC System

17 ステップ
(他社マニュアル法)

ProK を添加

血漿を添加

カラムに
ライゼートを添加

吸引

遠心

遠心

Maxwell® RSC ccfDNA Plasma Kit

- 圧倒的に簡便! たったの 3 ステップ
- 高純度で精製可能
- 1 ml 血漿用 (AS1480) と 4 ml 血漿用 (AX1114) の 2 タイプ

	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
自動核酸精製システム			
自動核酸精製装置			
Maxwell® RSC System	1 台	AS4500	2,800,000
ccfDNA 精製キット			
Maxwell® RSC ccfDNA Plasma Kit	48 回分	AS1480	96,000
Maxwell® RSC LV ccfDNA Kit, Custom	48 回分	AX1114	120,000

装置をお持ちでない方も!

装置のレンタルプログラム

RentaMAX



核酸精製のお悩みなら機器貸出 & コンサルティングのレンタマックスへ!



詳細、
お問合せ・お申込みは

www.promega.co.jp/rentamax/

いつものワークフローがレベルアップ ‘ちょいテク’

お得情報あり

DNA
精製

PCR

電気
泳動

日常的に行われている PCR から近年普及してきた次世代シーケンシングまで、質の高い DNA を調製することは実験を成功させるキーポイントであることに変わりはありません。誰でも簡単に、しかも確実に DNA を精製することは非常に重要です。市販の核酸精製キットの多くは遠心操作が多用されているため煩雑で操作ミスを招くこともあります。プロメガの DNA 精製システムの多くは遠心法だけでなく吸引法を選ぶことができ、より簡便、確実に DNA を精製することができます。

吸引法のススメ ～今日も遠心機は大混雑。そんなときどうする？～

プラスミドや PCR 産物の精製など、DNA 精製時の遠心ステップが煩雑ではありませんか？

吸引法なら面倒なカラムの入れ替え作業が不要なため手間と時間を大幅に低減でき、遠心機の占領時間を少なくして混雑緩和にも役立ちます。

シリカメンブレンテクノロジーを採用した DNA 精製システムである Wizard® および PureYield™ は、カオトロピックな条件下で核酸を選択的に捕捉するシリカの特性を活かした多孔性シリカメンブレンを共通の担体として利用し、優れた洗浄効率、乾燥特性、迅速な操作性などいくつかの優れた特性を持ちます。さらにこれらのキットは遠心法だけでなく吸引法による処理が可能です。

遠心法による洗浄ステップでは遠心操作を繰り返すため (Wizard® SV Minipreps の場合 3 回)、各ミニカラム / チューブを遠心機にセットし、遠心後に洗浄廃液を捨てる作業も同様に繰り返す必要があります。それに対して吸引法では吸引マニホールドにカラムを一度セットすれば面倒な洗浄廃液除去工程である煩雑なミニカラム / チューブの付け替えを繰り返す必要がありません。Wizard® および PureYield™ にはミニやラージ、96 ウェルプレートフォーマットなど処理量や処理数に応じたシステムがあり、それぞれに適した吸引マニホールドも用意されているため、実験に最適なシステムを選択できます。

シリカメンブレンテクノロジーと吸引法を組み合わせることで、DNA 精製ワークフローは今よりもっとシンプル化・効率化することができるのです。



吸引法のセットアップ例

手前の青い器具が Vac-Man® (吸引マニホールド) 吸引ポンプなど吸引装置に接続して使用する

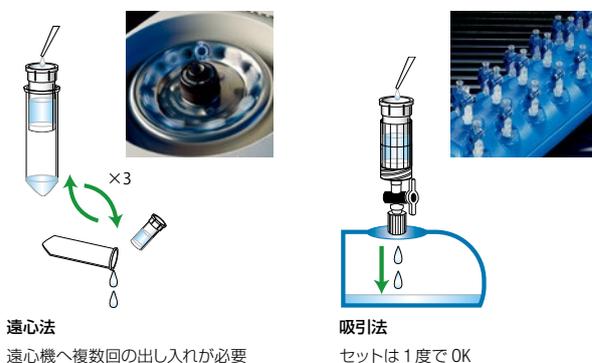


Vac-Man® 96

96 サンプルから一度に核酸精製を行うことができる吸引マニホールド

吸引法の特長

- ハイスピードな核酸精製
- 吸引マニホールド Vac-Man® で 20/96 サンプルを 1 度に精製
- 洗浄ステップが大幅に簡略化 (煩わしい遠心操作の繰り返しを低減) プラスミド、PCR 産物、ゲノム DNA、Total RNA の各種キットを用意



遠心法

遠心機へ複数回の出し入れが必要

吸引法

セットは 1 度で OK

吸引法スタートアップセット (プラスミド・PCR 産物精製)

お問合せの多い吸引ポンプを含む、便利なセットです



吸引ポンプ

吸引マニホールド (Vac-Man®)

核酸精製キット

セット内容、価格は次のページをご覧ください

吸引法をすぐにマスターしたい方、実験初心者の方
短時間のトレーニングで手技が身に付きます！

6月
開講

未経験者が明日からスペシャリスト!?
プロメガクラブ “寺子屋”

NEW
プロメガ
クラブ特典

プロメガの実験トレーニングサービスが始まります！
プロメガの小さなラボにてトレーナーがきめ細かく実験のノウハウをお教えします。テキストからは読み取れなかったコツをお持ち帰りいただけます。実験は一度体験するとしないとでは大違い！新入生や実験補助の方、もちろんベテランの方も、お気軽にお申込みください。

お申込み・詳細は www.promega.co.jp/promegaclub.html

今期のお題

1から始める吸引法
プラスミド抽出によるトレーニング

日程：6/7, 14, 21, 28 (火曜日)

午前コース 10:00 ~ 12:00

午後コース 15:00 ~ 17:00

場所：プロメガ株式会社 (東京都中央区日本橋)

参加費無料、各回とも定員 5 名前後

お申込み締め切り：各開催日の 7 日前まで

5 名以上でご参加希望のラボには
出張トレーニングもいたします！



かわら版掲載製品を特別価格でご提供!

本かわら版の各記事でご紹介した製品の一部を対象としたお試しキャンペーンです。

期間: 2016年4月18日~6月30日受注分まで



種別	製品名	サイズ	カタログ番号	定価(¥)	特別価格(¥)
2	NanoLuc ルシフェラーゼつすごい NanoBIT® PPI Flexi® Starter System	1 システム	N2015	180,000	108,000
	Nano-Glo® Live Cell Assay System	100 回分	N2011	28,000	22,400
	pNL1.3 [secNluc] Vector	20 µg	N1021	73,000	51,100
	pNL3.3 [secNluc/minP] Vector	20 µg	N1051	73,000	51,100
	pNL2.3 [secNluc/Hygro] Vector	20 µg	N1081	73,000	51,100
	pNL1.3.CMV [secNluc/CMV] Vector	20 µg	N1101	73,000	51,100
3	最新の GPCR 解析ツール: センサーからレポーターアッセイまで pGloSensor™ - 22F cAMP Plasmid	20 µg	E2301	114,000	79,800
	GloSensor™ cAMP Reagent	25 mg	E1290	57,000	45,600
	NanoBRET™ PPI MCS Starter System	1 セット	N1811	180,000	144,000
	NanoBRET™ PPI Flexi® Starter System	1 セット	N1821	150,000	120,000
	NanoBRET™ Nano-Glo® Detection System	1,000 回分	N1662	200,000	160,000
4	驚きの再現性: 発光レポーターを利用した ADCC アッセイ ADCC Reporter Bioassay, Complete (WIL2-S)	1 Kit	G7014	138,000	110,400
	マルチプレックス解析: 同一細胞サンプルを用いた細胞生存性試験と遺伝子発現解析 RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay	100 回分	G9711	20,000	14,000
5	ONE-Glo™ Luciferase Assay System	10 ml	E6110	22,000	15,400
	* 'ちょいテク': 吸引法のススメ (プラスミド・PCR 産物精製)				
7	Wizard® SV Gel and PCR Pump Set (セット販売①)	1	JKC003		
	Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	50 回分	A9281	13,000	
	x-tracta™ Gel Extractor	25 個	A2121	4,000	
	Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold, 20-sample capacity	1 セット	A7231	51,000	
	Welch Vacuum Pump, for Japan Electrical	1 台	A6724	90,000	
	Vacuum Adapters	20 個	A1331	3,000	
	Wizard® SV miniprep Pump Set (セット販売②)	1	JKC004		
	Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System + Vacuum Adapters	50 回分	A1340	14,000	
	Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold, 20-sample capacity	1 セット	A7231	51,000	
	Welch Vacuum Pump, for Japan Electrical	1 台	A6724	90,000	
	PureYield™ Midi & Maxi Pump Set (セット販売③)	1	JKC005		
	PureYield™ Plasmid Midiprep System	4 回分	A2490	7,000	
PureYield™ Plasmid Maxiprep System	2 回分	A2391	7,000		
Eluator™ Vacuum Elution Device	4 個	A1071	23,000		
Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold, 20-sample capacity	1 セット	A7231	51,000		
Welch Vacuum Pump, for Japan Electrical	1 台	A6724	90,000		

NanoLuc® ベクターをスペシャルオファー

NanoLuc® は最高感度を誇る発光レポーターで、レポーターアッセイでも最適なパフォーマンスを発揮します。今回シグナル解析用ベクター (非カタログ品 21 種を含む) を特別価格にてご提供!

期間: 2016年4月18日~6月30日受注分まで



製品名	サイズ	カタログ番号	定価(¥)	特別価格(¥)
NanoLuc® 応答配列レポーター				
pNL [NlucP/NFAT-RE/Puro] Vector	20 µg	-	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/NFAT-RE/Hygro] Vector	20 µg	-	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/CRE/Hygro] Vector	20 µg	-	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/p53-RE/Hygro] Vector	20 µg	-	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/ATF6-RE/Hygro] Vector	20 µg	-	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/ATF4-RE/Hygro] Vector	20 µg	-	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/MRE/Hygro] Vector	20 µg	-	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/HRE/Hygro] Vector	20 µg	-	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/GAS-RE/Hygro] Vector	20 µg	-	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/ISRE/Hygro] Vector	20 µg	-	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/SIE/Hygro] Vector	20 µg	-	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/STAT5-RE/Hygro] Vector	20 µg	-	非カタログ品	78,000

製品名	サイズ	カタログ番号	定価(¥)	特別価格(¥)
pNL [NlucP/AP1-RE/Hygro] Vector	20 µg	-	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/CEBP-RE/Hygro] Vector	20 µg	-	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/MycMax-RE/Hygro] Vector	20 µg	-	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/ARE/Hygro] Vector	20 µg	-	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/SRE/Hygro] Vector	20 µg	-	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/SRF/Hygro] Vector	20 µg	-	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/SBE/Hygro] Vector	20 µg	-	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/TCF/LEF-RE/Hygro] Vector	20 µg	-	非カタログ品	78,000
pNL [NlucP/XRE/Hygro] Vector	20 µg	-	非カタログ品	78,000
pNL3.2.NF-B-RE [NlucP/NF-B-RE/Hygro] Vector	20 µg	N1111	73,000	51,100

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2016年4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