

テクニカルマニュアル

# Nano-Glo® HiBiT

## Extracellular Detection System

(細胞外検出システム)

使用説明書 (対象製品 : N2420、N2421、N2422)

この日本語マニュアルは英文マニュアルを翻訳したものです。常に更新されるものではありません。最新の英文マニュアルについては以下のサイトよりご覧ください。 [www.promega.jp/resources/protocols/](http://www.promega.jp/resources/protocols/) より資料番号“TM523”を検索ください。

本システムの使用に関するご質問は、プロメガテクニカルサービスまで E メールでお問い合わせください：  
[prometec@jp.promega.com](mailto:prometec@jp.promega.com)

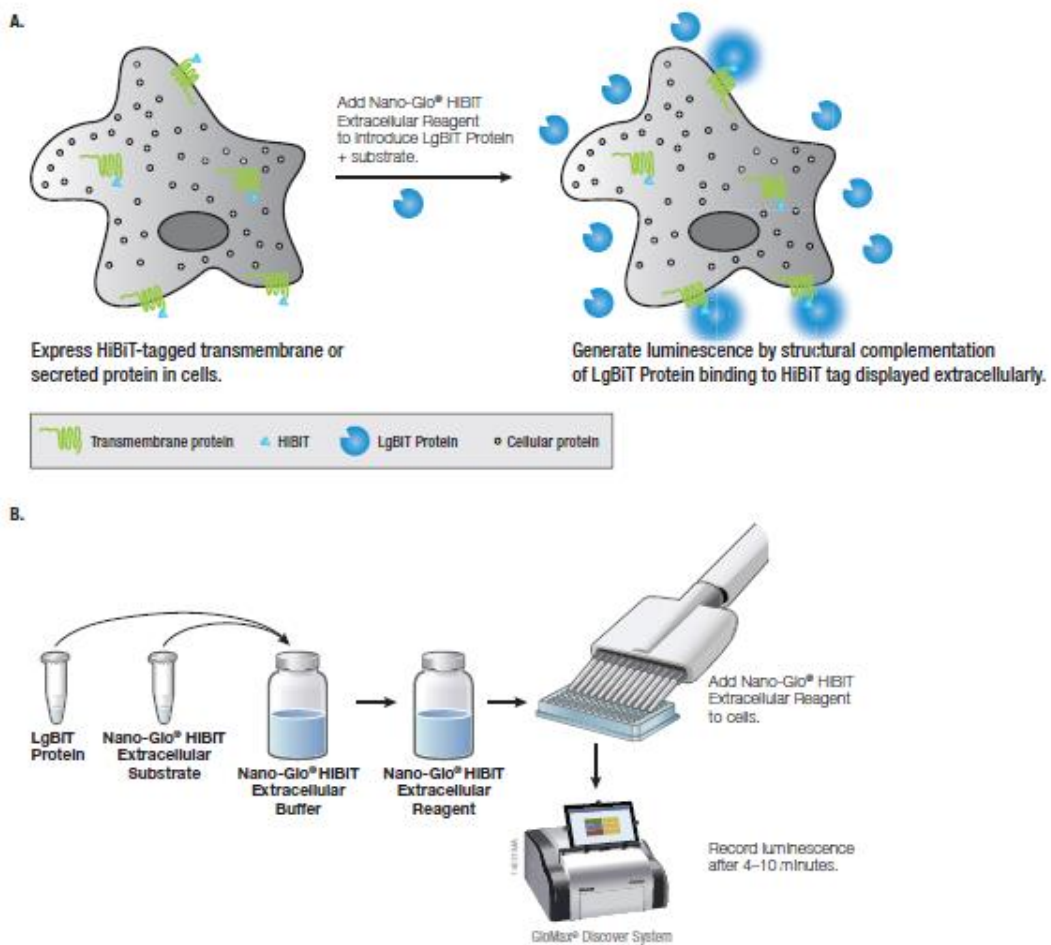
# Nano-Glo® HiBiT Extracellular Detection System

1. 製品説明	3
2. 製品コンポーネントおよび保存条件	5
3. Nano-Glo® HiBiT Extracellular Assay プロトコール	7
3.A. Nano-Glo® HiBiT Extracellular Detection System の概要	7
3.B. Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent の調製	7
3.C. 細胞への Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent の添加の一般的プロトコール	8
3.D. 高速測定のための代替プロトコール	9
4. 代表的データ	10
5. 関連製品	16
6. 付録	16
6.A. Nano-Glo® HiBiT Extracellular Assay の概要	16
6.B. 目的のタンパク質への HiBiT の付加	17
6.C. アッセイパフォーマンスに対する発現レベルの影響	22
6.D. HiBiT コンストラクトのトランスフェクション	23
6.E. 培地除去と 1×Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent 添加の代替プロトコール	24
6.F. リアルタイム測定のための代替プロトコール	25
6.G. 細胞外 HiBiT シグナルと溶解 HiBiT シグナルの比較	26
6.H. 一般的なアッセイコンポーネントの影響	29
6.I. アッセイ感度の最大化	34
6.J. トラブルシューティング	35
6.K. 参考文献	38

## 1. 製品説明

Nano-Glo® HiBiT Extracellular Detection System<sup>(a,b,c)</sup> では、混ぜて測定するだけのシンプルなアッセイプロトコルを用いて、細胞膜で発現あるいは細胞外培地へ分泌した HiBiT タグ付きタンパク質を高感度で定量することができます。HiBiT は 11 アミノ酸で構成されるペプチドタグで、目的のタンパク質の N 末端または C 末端に融合させるか、タンパク質内部のアクセス可能な位置に挿入します。細胞表面上あるいは分泌された HiBiT タグ付きタンパク質の量は、基質となる furimazine (フリマジン)、および NanoLuc Binary Technology (NanoBiT®、1) で使用される 2 つのサブユニットのうち、大きいサブユニットである Large BiT (LgBiT、図 1) が含まれる細胞非溶解性検出試薬を添加して測定します。低い親和性 ( $K_D=190 \mu M$ ) で LgBiT に結合する Small BiT (SmBiT、11 アミノ酸) とは異なり、HiBiT は LgBiT に強く結合し ( $K_D=0.7 nM$ )、複合体の形成を促進して明るく光る発光酵素を生成します。Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent 添加後に発生した発光の量は、細胞外の培地に接触可能な HiBiT タグ付きタンパク質の量と 7 桁にわたり比例します (図 2)。

目的タンパク質は、HiBiT 発現ベクターを用いて N 末端または C 末端に HiBiT タグを付加することができます。また別の方法として、標準的な方法で HiBiT タグを既存の発現ベクターに付加することもできます。さらに CRISPR/Cas9 のようなゲノム編集ツールを使って HiBiT タグを内在性ローカスに付加することもできます。この CRISPR/Cas9 システムでは、タグのサイズが小さいため一本鎖のドナー DNA を用いて効率的な挿入が可能であり、明るいシグナルにより内因性発現レベルの少ないタンパク質でも定量が可能となります。



### 図 1. Nano-Glo® HiBiT Extracellular Detection System

パネル A : Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent を哺乳細胞に添加することで、非溶解性試薬に含まれる細胞非透過性の LgBiT タンパク質を供給します。細胞外の培地に供給された LgBiT は HiBiT タグに結合し、細胞表面上あるいは分泌された HiBiT タグ付きタンパク質の量に比例した光を生じます。パネル B : Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent は、非溶解性バッファーに LgBiT Protein および基質を添加して調製します。この調製した試薬を細胞に添加して 2~10 分後の発光をルミノメーターで測定します。

## 1. 説明 (続き)

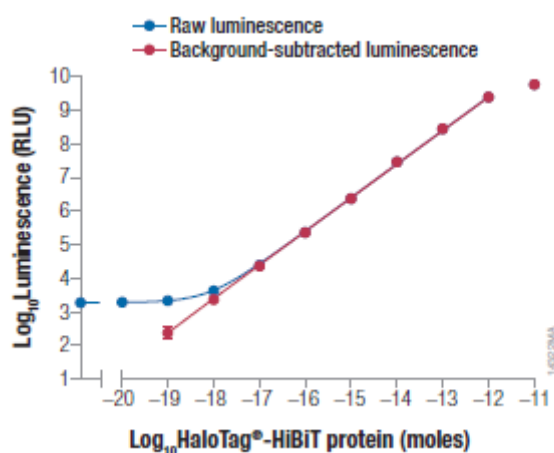


図 2. 精製済み HiBiT タグ付きタンパク質の定量

Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent を表示量の精製済み HaloTag®-HiBiT タンパク質に添加し (4)、2 分後の発光を測定しました。赤色の線はバックグラウンドを引いたデータのベストフィットラインで、少なくとも 7 桁のリニアダイナミックレンジを確認できます ( $r^2=0.9982$ )。エラーバーは  $n=4$  の標準偏差を示しています。

## 2. 製品コンポーネントおよび保存条件

製品	サイズ	カタログ番号
Nano-Glo® HiBiT Extracellular Detection System	10ml	N2420
各システムには試薬 10 mL を調製するのに十分な量のコンポーネントが含まれています。本システムには以下のコンポーネントが含まれます：		
<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 10ml Nano-Glo® HiBiT Extracellular Buffer</li> <li>・ 0.2ml Nano-Glo® HiBiT Extracellular Substrate</li> <li>・ 0.1ml LgBiT Protein</li> </ul>		

製品	サイズ	カタログ番号
Nano-Glo® HiBiT Extracellular Detection System	100ml	N2421
各システムには試薬 100 mL を調製するのに十分な量のコンポーネントが含まれています。本システムには以下のコンポーネントが含まれます：		
<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 100ml Nano-Glo® HiBiT Extracellular Buffer</li> <li>・ 2 × 1ml Nano-Glo® HiBiT Extracellular Substrate</li> <li>・ 1ml LgBiT Protein</li> </ul>		

製品	サイズ	カタログ番号
Nano-Glo® HiBiT Extracellular Detection System	10 × 100ml	N2422
<p>各システムには試薬 1,000 mL を調製するのに十分な量のコンポーネントが含まれています。本システムには以下のコンポーネントが含まれます：</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 10 × 100ml Nano-Glo® HiBiT Extracellular Buffer</li> <li>・ 5 × 4ml Nano-Glo® HiBiT Extracellular Substrate</li> <li>・ 10 × 1ml LgBiT Protein</li> </ul>		

**保存条件：** Nano-Glo® HiBiT Extracellular Detection System のコンポーネントは-20°C で保存してください。25°C 以上で解凍してはいけません。Nano-Glo® HiBiT Extracellular Buffer は室温で 1 年間保存できます。Nano-Glo® HiBiT Extracellular Substrate および LgBiT Protein は-20°C で凍結しません。

#### 関連製品

製品	サイズ	カタログ番号
Nano-Glo® HiBiT Blotting System	100ml	N2410
Nano-Glo® HiBiT Lytic Detection System	10ml	N3030
	100ml	N3040
	10 × 100ml	N3050
HiBiT Control Protein	100 μl	N3010

#### HiBiT クローニングベクター

ベクター名	クローニング フォーマット	タグ オリエンテーション	カタログ番号
pBiT3.1-N [CMV/HiBiT/Blast]	MCS	HiBiT-POI	N2361
pBiT3.1-C [CMV/HiBiT/Blast]	MCS	POI-HiBiT	N2371
pBiT3.1-secN [CMV/HiBiT/Blast]	MCS	IL6-HiBiT-POI	N2381
pFC37K HiBiT CMV-neo Flexi® Vector	Flexi	POI-HiBiT	N2391
pFN38K HiBiT CMV-neo Flexi® Vector	Flexi	HiBiT-POI	N2401
pFN39K secHiBiT CMV-neo Flexi® Vector	Flexi	IL6-HiBiT-POI	N2411

### 3. Nano-Glo® HiBiT Extracellular Assay プロトコール

#### 3.A. Nano-Glo® HiBiT Extracellular Detection System の概要

Nano-Glo® HiBiT Extracellular Detection System は、細胞外の培地に接触した HiBiT タグを定量します。このアッセイでは一般的に使用される細胞培養培地に 0~10%の血清を添加したものを使用することができ、DMEM、RPMI 1640、McCoy's 5A、MEMα、Opti-MEM® I、F-12、および CO<sub>2</sub>非依存培地で検証済みです。試薬は 22°C におけるシグナル半減期が 60 分を上回るように処方されていますが、培地と血清の組み合わせが変わるとバックグラウンド、シグナル、またはシグナル減衰速度に影響を及ぼす可能性があります(セクション 6H を参照)。Nano-Glo® HiBiT Extracellular Detection System に関する追加情報はセクション 6 でご確認ください。

低い光量で直線性のあるアッセイパフォーマンスを達成するためには、すべての測定値からバックグラウンド発光を引く必要があります。一般的にバックグラウンド発光には以下の 2 つの主な発生源があります：1) furimazine 基質の自家発光および LgBiT タンパク質と関連する低レベル活性に由来する試薬バックグラウンド、および 2) ルミノメーター由来の機器バックグラウンド。試薬バックグラウンドは培地の種類により異なり、血清と細胞のいずれによっても上昇します(セクション 6.H を参照)。したがって、存在量の少ないタンパク質の測定で最大限の正確さを達成するためには、同じ培地を用いた非トランスフェクション細胞またはモックトランスフェクション細胞のサンプルを含めてアッセイバックグラウンドを測定します。感度を最大限に高めるには、アッセイ前に培地を交換して血清量を減らします(セクション 6.I を参照)。ウェル間のクロストークと放射光の吸収を最小限に抑えるために白色の組織培養プレートを使用します。使用するプレートは発光測定装置に対応していることを確認してください。

#### 3.B. Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent の調製

目的の実験を実施するのに必要な Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent の量を計算します。これは通常、ウェルに入れる培地の総量と同量に、分注作業に要する余剰分を足した量となります。未使用のチューブに入れた適量の Nano-Glo® HiBiT Extracellular Buffer (室温) で LgBiT Protein を 1 : 100、Nano-Glo® HiBiT Extracellular Substrate を 1:50 に希釈し、転倒混和します。

例えば、4 mL の Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent が必要な場合、4 mL の Nano-Glo® HiBiT Extracellular Buffer を 15 mL の遠心チューブに移し、40 μL の LgBiT Protein および 80 μL の Nano-Glo® HiBiT Extracellular Substrate を添加します。

#### 備考：

1. LgBiT Protein の原液には、 $-20^{\circ}\text{C}$ での凍結を防ぐためにグリセロールが添加されています。この溶液は粘度があるためピペッティングが難しいことがあります。ゆっくりとピペッティングし、ピペットチップの外側に余分な溶液が付着しないようにしてください。可能であればポジティブディスプレイメント式ピペットを使用してください。
2. Nano-Glo® HiBiT Extracellular Substrate や LgBiT Protein がキャップやチューブの側面に溜まっている場合には、チューブを軽くマイクロ遠心機にかけます。
3. Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent は使用するたびに新たに調製することをおすすめします。調製後は活性が室温において8時間で約15%、24時間では約60%低下します。未使用の調製後試薬は後で使用するために $-80^{\circ}\text{C}$ 、 $-20^{\circ}\text{C}$ 、または $4^{\circ}\text{C}$ で保存できますが、調製直後の試薬と比べると性能は幾分低下します。 $4^{\circ}\text{C}$ で保存する場合、調製済み試薬は24時間での活性の低下が20%未満となります。

#### 3.C. 細胞への Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent の添加の一般的プロトコール

1. セクション 3.B.の手順に従って Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent を調製します。
2. HiBiT タグ付きタンパク質を発現している哺乳類細胞が入ったプレートを $37^{\circ}\text{C}$ のインキュベーターから取り出します。

**オプショ**ン：温度差により引き起こされるウェル間のばらつきを最小限に抑えるために、プレートを室温に平衡化します（例えば、金属ブロック上に5分間置いておく）。

3. 各ウェルに入っている培養培地と同量の Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent を加え、混和させます。例えば、 $100\ \mu\text{L}$ の細胞培養培地に対して $100\ \mu\text{L}$ の Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent を加えます。

**備考**：サンプルはゆっくりとピペッティングして混和させるか、プレートをオービタルシェーカー（ $300\sim 500\ \text{rpm}$ ）に置いて3~10分混和させます。

4. 試薬添加10分後の発光を測定します。HiBiT タグをタンパク質配列中に挿入する場合、タンパク質末端にタグ付けする場合と比べて必要なインキュベーション時間が長くなる可能性があります。お使いの装置に固有の設定を用いて発光を測定します。GloMax®装置で96ウェルプレートを使用する場合、測定時間（integration time）は0.5~2秒が推奨されます。測定時間を延長すると、発現レベルが低い場合のデータクオリティが改善される可能性があります。発光強度は、条件に左右されますが一般的には、十分に混和させたサンプルではシグナル半減期が1~2.5時間で減衰します（図8のパネルB、図9のパネルB、および図10のパネルBを参照）。



#### 備考：

1. 発光がサンプルに含まれる HiBiT タグ付きタンパク質の量と比例するためにアッセイバックグラウンドを引きませんが、これは特に微量なタンパク質の測定で重要です。バックグラウンドコントロールとして非トランスフェクション細胞またはモックトランスフェクション細胞を実験に含めます（セクション 6.I を参照）。
2. HiBiT が細胞外表面ループなどのタンパク質内部に位置する場合、LgBiT と HiBiT の平衡化に時間がかかることがあります。これを補うために、必要に応じて試薬インキュベーション時間を延長します。

#### 3.D. 高速測定のための代替プロトコール

本プロトコールでは、付着細胞の表面にある HiBiT タグを迅速に定量できます。細胞の生物学的状態が急速に変化している場合（細胞表面受容体のアゴニスト誘導性インターナリゼーションなど）に有用です。

1. HiBiT タグ付きタンパク質を発現している哺乳動物細胞が入ったプレートを 37°C のインキュベーターから取り出します。
2. 直ちに各ウェルに入っている培養培地と同量の Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent（室温）をゆっくりと分注します（混ぜないでください）。HiBiT タグ付きタンパク質が LgBiT Protein および furimazine 基質と迅速に平衡化されるようにするため、試薬は細胞培養培地よりもわずかに密度が高くなっています。以下の手順に従って室温または 37°C のルミノメーター中でインキュベートします。
  - a. **室温ルミノメーターの場合：**室温の試薬を添加後、発光測定までプレートは室温でインキュベートします。プレートは室温ルミノメーターの内部または外部（金属ブロックの上など）に置いて、すべてのサンプルを同じ温度に平衡化し、温度勾配によるウェル間のばらつきを低減します。
  - b. **37°C ルミノメーターの場合：**別の方法として、プレートを 37°C ルミノメーターに置いて細胞を 37°C に維持することもできます。試薬添加後、直ちにプレートをルミノメーター内に置き、発光測定までインキュベートします。プレートは試薬添加後に 37°C のインキュベーター内でインキュベートした後、ルミノメーターに移動することもできます。プレート取り扱い中の温度変動を予防するために、96 ウェルプレートの内側の 60 ウェルのみを使用することをおすすめします。37°C のインキュベーターから取り出したときにサンプル温度を維持できるようにするため、細胞をプレーティングする間、外側の空のウェルと内部の空いているウェルに 150  $\mu$ L の滅菌バッファーをピペットで満たします。分注直前に試薬を 37°C に温めることは通常は不要であり、温めることで試薬安定性に悪影響を及ぼすことになります。
3. 試薬添加 2~10 分後に発光を測定します。一般的に、反復実験間でのウェル間のばらつきを抑えて最大限の発光を得るには 4 分間のインキュベーションで十分です。お使いの装置に固有の設定を用いて発光を測定します。GloMax®装置で 96 ウェルプレートを使用する場合、測定時間（integration time）は 0.5~2 秒が推奨されます。短い測定時間ではプレートをより迅速に測定することにより、状態が急激に変化する実験系におけるプレート全体のばらつきが低減する可能性があり、長い測定時間では低レベルの発現におけるデータクオリティが改善される可能性があります。

#### 備考：

- 十分に混和されたサンプルの発光強度はシグナル半減期が 1~2.5 時間となりますが、上記のように試薬をゆっくりと添加して混和させない場合はシグナル強度の変化がより急激になります。本プロトコールでは、シグナルは一般的に試薬添加から 4 分後に最大になりますが、その後サンプルが混ざっていくに伴ってより急速に減衰し、シグナル半減期が約 30 分になります。このような理由から、プレート上の最初の測定と最後の測定の間には発生するシグナル減衰により引き起こされるばらつきを低減するために、測定時間を短縮してプレート全体の測定にかかる時間を最短にすることをおすすめします。
- 細胞表面の発現変化を評価する際、融合パートナーを伴う LgBiT/HiBiT 複合体のインターナリゼーションは一般的にほとんど問題になりません。本プロトコールで使用される短いインキュベーション時間では LgBiT のインターナリゼーションが最小限に抑えられます。さらに、インターナライズした LgBiT/HiBiT 複合体は細胞表面複合体よりも大幅に活性が低下していることが多く、これは細胞表面のタンパク質と比べてエンドソームでは利用可能な基質が少なくなっていることが原因であると考えられます。

#### 4. 代表的データ

##### アゴニストによる刺激後の $\beta 2$ アドレナリン受容体インターナリゼーションのモニタリング

$\beta 2$  アドレナリン受容体 ( $\beta 2AR$ ) は 7 回膜貫通型の G タンパク質共役型受容体 (GPCR) であり、アドレナリンおよび合成アゴニストが結合して生物体におけるさまざまな生理学的反応を引き起こします。アゴニストの結合により促進性 G タンパク質 (Gs) の活性化が引き起こされ、細胞内 cAMP の増加とプロテインキナーゼ A の活性化が促進されます。シグナルは下流ターゲットのリン酸化反応を介して伝播し、受容体のリン酸化が  $\beta$  アレスチン 2 のリクルートメントを引き起こします。 $\beta$  アレスチン 2 の結合により受容体は G タンパク質から脱共役し、クラスリン媒介エンドサイトーシスが促進され、その後ほとんどの受容体は迅速に細胞膜へとリサイクルされます。

Nano-Glo® HiBiT Extracellular Detection System では、GPCR の活性化およびインターナリゼーションを定量化できます。 $\beta 2AR$  をモデルシステムとして使用して、完全アゴニストおよび部分アゴニストのパネルによる処理後に内在性 HiBiT- $\beta 2AR$  および過剰発現した HiBiT- $\beta 2AR$  をモニタリングしました。HiBiT はリンカーなし、または 10 アミノ酸の Gly/Ser 配列を結合した状態で開始メチオニンの後に挿入しました (図 3)。さまざまな発現レベルを達成するためにさまざまな量のプラスミド DNA をトランスフェクションし、これらの条件を安定発現および内在性遺伝子座からの発現と比較しました。内因性発現については、CRISPR/Cas9 遺伝子編集アプローチを用いて迅速に細胞プールを作成し (5)、その後個々のクローンを単離しました。

予測どおり、 $\beta 2AR$  の既知のアゴニストは受容体インターナリゼーションを促進し、その作用強度の順位には予測どおりの差がありました。また、部分アゴニストであるサルブタモールおよびサルメテロールではインターナリゼーションの程度において予想された低減が確認されました (7)。これらの実験は、アゴニスト処理済み細胞を 37°C、5% CO<sub>2</sub> のインキュベーターから取り出してから 5 分以内に実施しました。内因性発現、安定発現、および少量 DNA の一過性トランスフェクションでは、多量の DNA をトランスフェクションしたものと比べて大きな応答 (fold response) が得られました (セクション 6.C)。一般的に、発現レベルが低い方が受容体インターナリゼーション実験に適しています。

#### 4. 代表的データ (続き)

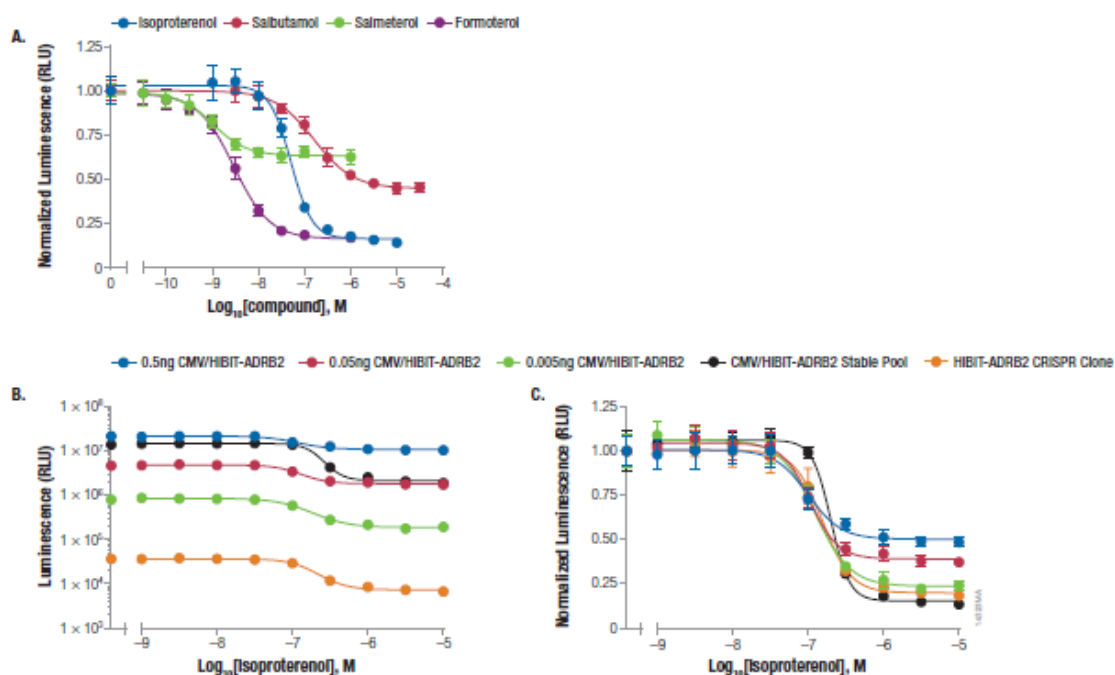


図 3. アゴニストによる刺激後の HiBiT-β 2AR のインターナリゼーション

パネル A : 安定トランスフェクションした HEK293 細胞のプールは、CMV プロモーターより HiBiT-GGSGGGGSGG-β 2AR を発現するコンストラクトを用いて作製しました。細胞はさまざまなリガンドの滴定で 30 分間処理した後、Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent を各ウェルに添加し、セクション 3.D のプロトコールに従って 4 分後に発光を測定しました。バックグラウンドを引いた発光値は無処理細胞に対して補正しました。パネル B : HEK293 細胞は、キャリア DNA で希釈した CMV HiBiT-β 2AR 発現コンストラクトをさまざまな量で一過性トランスフェクションしました。これらの細胞をパネル A の安定トランスフェクションしたプールおよび内在性遺伝子座から HiBiT-β 2AR を発現する HEK293 クローンと比較しました。細胞は 96 ウェルプレートにプレーティングし、翌日、イソプロテレンールの滴定で 30 分間処理しました。Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent をすべてのウェルに添加し、4 分後にセクション 3.D のプロトコールを用いて発光を測定しました。バックグラウンドを引いた発光値をプロットしてさまざまな発現レベルを明らかにしました。パネル C : パネル B の実験の発光を補正したものをイソプロテレンール無添加のコントロールに対してプロットしました。エラーバーは n=6 の標準偏差を表しています。

## アゴニストによる刺激後の上皮増殖因子受容体インターナリゼーションのモニタリング

上皮増殖因子受容体 (EGFR) は、EGF ファミリーの増殖因子が結合する受容体型チロシンキナーゼ (RTK) です。アゴニストの結合は受容体自己リン酸化および SH2 ドメインを持つアダプタータンパク質のリクルートメントを引き起こし、その結果、下流のシグナル伝達経路が活性化されます。活性化した受容体はクラスリン媒介エンドサイトーシスを経て、その後細胞膜へとリサイクリングされるか、後期エンドソーム/リソソームの中で分解されます。

Nano-Glo® HiBiT Extracellular Detection System では、RTK の活性化およびインターナリゼーションを定量化できます。例として、EGFR をモデルシステムとして用いて、EGF 処理後に内在性 HiBiT-EGFR および過剰発現した HiBiT-EGFR のインターナリゼーションをモニタリングしました。HiBiT タグはネイティブシグナルペプチドと成熟 EGFR との間に挿入しましたが、場合によってはネイティブシグナルペプチドと IL-6 シグナルペプチドを置き変えました。一部のクローンでは、短い Gly/Ser リンカーで HiBiT と成熟 EGFR を融合させました。CMV または HSV-TK をプロモーターとする発現コンストラクトはキャリア DNA で希釈して、細胞にトランスフェクションする際に発現レベルを低下させました。得られた結果は CRISPR/Cas9 遺伝子編集アプローチを用いて内在性遺伝子座からの HiBiT-EGFR の発現と比較して、迅速に細胞プールを作製しました (5)。

予測どおり、EGF は HiBiT-EGFR の受容体インターナリゼーションを促進しました (図 4)。これらの測定は、アゴニスト処理済み細胞を 37°C、5% CO<sub>2</sub> のインキュベーターから取り出してから 5 分以内に実施しました。細胞表面での発現における最大の倍率低下は内因性発現を用いた場合に確認され、発光は 10 倍以上減少しました。

#### 4. 代表的データ (続き)

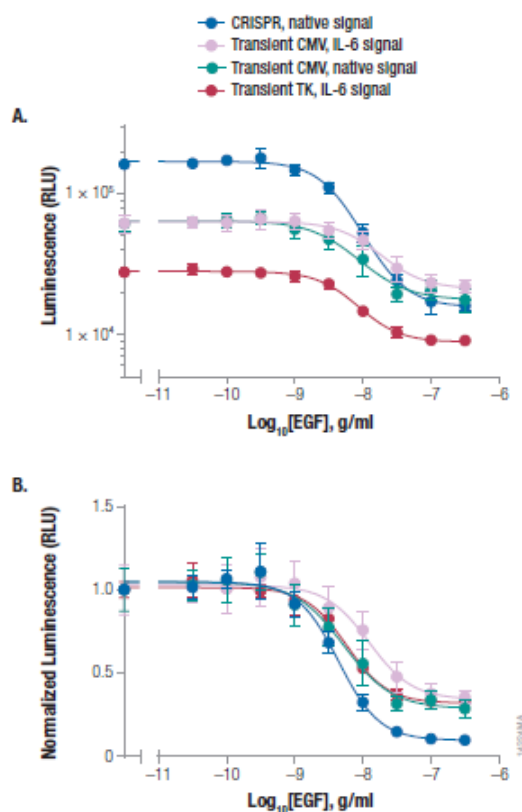


図 4. EGF 刺激後の HiBiT-EGFR のインターナリゼーション

パネル A: HeLa 細胞はキャリア DNA で希釈した CMV プロモーターを持つ発現コンストラクト (0.005 ng/ウェル) または HSV-TK プロモーターを持つ発現コンストラクト (0.05 ng/ウェル) で一過性トランスフェクションしました。一過性トランスフェクションは CRISPR 由来の細胞プールを用いた内在性遺伝子座からの発現と比較しました。発現コンストラクトでは、HiBiT タグはネイティブシグナル配列の直後に挿入するか、ネイティブシグナル配列と IL-6 シグナル配列および HiBiT と置き換えました。細胞は 96 ウェルプレートにプレーティングし、翌日、EGF の滴定で 30 分間処理しました。Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent をすべてのウェルに添加し、4 分後にセクション 3.D のプロトコルを用いて発光を測定しました。バックグラウンドを引いた発光をプロットし、上記 4 条件下での平均発現レベルはほぼ同じであることが確認されました。パネル B: パネル A の実験で得られた発光を補正し、EGF 無添加のコントロールに対してプロットしました。トランスフェクションで使用したプラスミドコンストラクトは一過性 CMV、IL-6 シグナル=CMV/IL6-HiBiT-GSSG-EGFR (25-1210)、一過性 CMV、ネイティブシグナル=CMV/EGFR(1-24)-HiBiT-GSSG-EGFR (25-1210)、および一過性 TK、IL-6 シグナル=HSV-TK/IL6-HiBiT-GSSGEGFR (25-1210)。エラーバーは n=6 の標準偏差を表しています。

#### PCSK9-HiBiT の分泌

プロタンパク質転換酵素サブチリシン・ケキシン 9 型 (PCSK9) は、小胞体において自己タンパク質分解プロセッシングを経た後、細胞膜へと運ばれ分泌されます。分泌された PCSK9 は LDL 受容体の分解を促進し、PCSK9 の機能喪失型変異は冠動脈疾患からの防御と関連しています。例えば、C679X 変異は、タンパク質分解活性を低下させずに分泌を阻害するミスフォールディングを引き起こします (2)。一方、プロテアーゼドメインの触媒ヒスチジンで H226A の変異を発生さ

せると、自己タンパク質分解が妨げられ、タンパク質分泌が阻害されます (6)。

Nano-Glo® HiBiT Extracellular Detection System は、細胞から培地を除去するなどの複数のステップが不要で、HiBiT タグを付けた目的のタンパク質の分泌を数分以内に定量できるため、分泌タンパク質の発現、プロセッシング、または輸送を変化させる化合物のハイスループットスクリーニングに最適です。さらに、Nano-Glo® HiBiT Lytic Detection System を用いれば目的タンパク質の総量を平行して測定することができるためタンパク質発現の変化をタンパク質輸送の変化と区別することが可能になります。

Nano-Glo® HiBiT Extracellular Detection System を用いて培地に分泌された PCSK9-HiBiT の量をモニタリングし、Nano-Glo® HiBiT Lytic Detection System を用いて総タンパク質レベルを経時的に評価しました。野生型タンパク質を分泌不全の変異型および分泌を阻害するためにブレフェルジン A (BFA) 処理した変異型と比較しました。HEK293 細胞は、バルクで CMV プロモーターを持つ発現コンストラクトを一過性トランスフェクションしました。その翌日、細胞を解離させ、再懸濁し、BFA または溶媒コントロールで迅速に処理するためにプレーティングしました。時間ゼロにおいて、細胞溶解アッセイでは PCSK9 のすべての型で目的タンパク質総量のレベル (細胞内外の和) がほぼ同じであることが確認されたにもかかわらず、PCSK9 の変異型ではアッセイバックグラウンドレベルに近い細胞外発光シグナルを生成しており、野生型タンパク質では、バックグラウンドをはるかに上回る発光シグナルが確認されました。これは、培地交換や細胞洗浄では細胞外 HiBiT シグナルがすべて除去されるわけではないという一般的な観察結果を示しています。このシグナルは損傷細胞や細胞片に含まれるタンパク質、細胞の外側に結合したタンパク質、または残留する培地に含まれるタンパク質により引き起こされている可能性があります。HiBiT タグ付きタンパク質の分泌速度またはその程度の差を測定する実験の場合、誘導性発現系は細胞処理前に細胞外での蓄積を低減させることでこのようなタンパク質バックグラウンドを低下させるために有用である可能性があります。

図 5 で分かるように、野生型 PCSK9 からの細胞外シグナルは、タンパク質の発現と分泌に伴って経時的に徐々に増加しています。しかしながら、BFA 処理は、溶解アッセイで測定されたようにタンパク質発現にほとんど影響を与えずにタンパク質の分泌を効果的に阻害しています。同様に、このタンパク質の変異型では実験の間に細胞外シグナルの蓄積がほとんど確認されません。変異型タンパク質の総量は経時的にほとんど変化しませんが、これは細胞内のタンパク質レベルが実験開始時にすでにほぼ定常状態レベルに達していたためであったと考えられます。

#### 4. 代表的データ (続き)

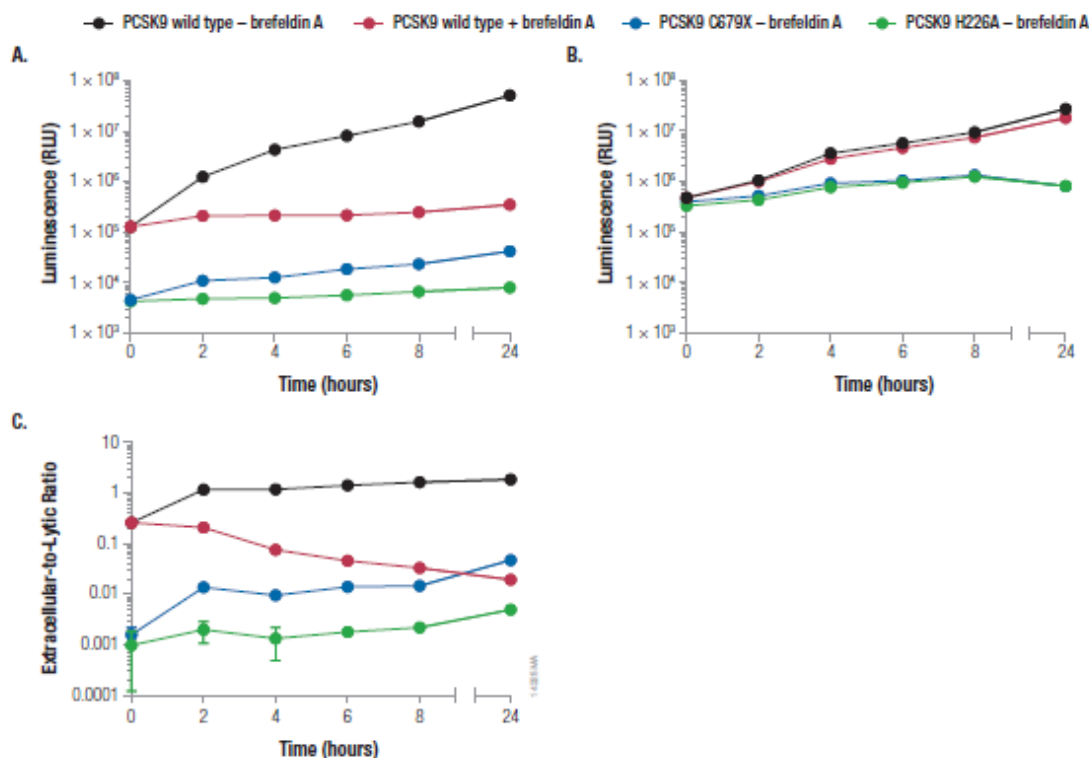


図 5. PCSK9-HiBiT 分泌に対するプレフェルジン A または変異の影響

HEK293 細胞は、野生型配列または分泌を阻害してタンパク質の小胞体への蓄積を引き起こす変異 (H226A または C679X) を持つ CMV/PCSK9-HiBiT 発現コンストラクトで一過性トランスフェクションしました。トランスフェクション細胞は解離、洗浄し、培地に再懸濁してプレーティングした後、直ちに時間ゼロにおいて溶媒コントロールまたは分泌を阻害するための 1  $\mu$ M のプレフェルジン A (BFA) で処理しました。プレーティングと処理後のさまざまな時点において、複製プレートを 37°C インキュベーターから取り出し、Nano-Glo<sup>®</sup> HiBiT Extracellular または Lytic Reagent を各ウェルに添加しました。セクション 3.D のプロトコールに従って 10 分後に発光を測定しました。パネル A : Nano-Glo<sup>®</sup> HiBiT Extracellular Assay で得られた未処理の発光は、野生型 PCSK9 ではタンパク質の発現および分泌に伴い経時的に増加しましたが、BFA が効果的に分泌を阻害しました。変異型タンパク質はいずれも細胞外タンパク質のレベルが非常に低く、試薬バックグラウンドとほぼ同じでした。パネル B : Nano-Glo<sup>®</sup> HiBiT Lytic Assay で得られた未処理の発光から、BFA が野生型 PCSK9 のタンパク質発現は阻害せず、分泌のみを阻害することが確認できます。時間ゼロにおいて、PCSK9 の変異型は野生型 PCSK9 レベルとほぼ同じレベルで存在していますが、総タンパク質量は実験の間ほとんど変化していません。パネル C : バックグラウンドを引いた細胞外シグナル (Nano-Glo<sup>®</sup> HiBiT Extracellular Assay で得られたシグナル) と溶解シグナル (Nano-Glo<sup>®</sup> HiBiT Lytic Assay で得られたシグナル) の比は、野生型 PCSK9 では最初は増加しますが、2 時間後、ほぼすべてのタンパク質が細胞外にあり、比較的一定した高い値となります。同様に、このタンパク質の変異型は時間が経っても細胞内にとどまるため、シグナル比は低いレベルで比較的一定のままです。野生型 PCSK9 を BFA 処理することで細胞内タンパク質の蓄積が増加するため、シグナル比は変異型に近い値になるまで経時的に低下し続けます。エラーバーは n=6 の標準偏差を表しています。

## 5. 関連製品

Product	Size	Cat.#
Mammalian Lysis Buffer	40ml	G9381
Digitonin (20mg/ml)	40µl	G9441
NanoBiT® PPI MCS Starter System	1 each	N2014
NanoBiT® PPI Flexi® Starter System	1 each	N2015
FuGENE® HD Transfection Reagent	1 ml	E2311
	5 × 1 ml	E2312
ViaFect™ Transfection Reagent	0.75 ml	E4981
	2 × 0.75 ml	E4982
Transfection Carrier DNA	5 × 20µg	E4881
GloMax® Discover System	1 each	GM3000
GloMax® Explorer Fully Loaded	1 each	GM3500
GloMax® Explorer with Luminescence and Fluorescence	1 each	GM3510

## 6. 付録

### 6.A. Nano-Glo® HiBiT Extracellular Assay の概要

膜タンパク質の細胞表面発現における変化は、生物学的調節機構および環境変化に対する細胞応答において大きな役割を果たします。しかしながら、細胞膜におけるタンパク質の量を細胞内に貯蔵されているものと区別して正確に定量することは困難です。細胞表面発現の変化をモニタリングする際に一般的に使用されるアプローチは細胞ベースの ELISA ですが、これは細胞の固定、そして抗体結合や洗浄などの複数のステップを必要とする労力のかかる手順であり、ウェル間のばらつきが大きくなり、スループットが低下します。さらに、このプロセスでは内因性発現レベルでタンパク質を検出するための高品質の抗体が必要です。

11 のアミノ酸で構成される High BiT (HiBiT) ペプチドタグは一般的に使用されているエピトープタグに匹敵します。細胞非透過性 Large BiT (LgBiT、17.6 kDa) と併用することで、細胞表面発現あるいは分泌した HiBiT タグ付きタンパク質は 7 桁のリニアダイナミックレンジにわたり高感度で定量されます (図 2)。細胞ベースの ELISA と対照的に、Nano-Glo® HiBiT Extracellular Assay ではハイスループットスクリーニングに適したシンプルなアッセイプロトコルを用いて内因性発現レベルの HiBiT タグ付きタンパク質を 5 分以内で定量できます。

ルシフェラーゼは、幅広いダイナミックレンジと高い感度を持つため、遺伝子発現レベルとタンパク質レベルのモニタリングで広く使用されています。NanoLuc®ルシフェラーゼは、他のレポータータンパク質よりもさらに明るく、汎用性を高めるために開発された 19.1 kDa の改変酵素です (3)。NanoLuc®ルシフェラーゼはその後、Nano-Glo® Binary Technology (NanoBiT®) と呼ばれる 2 つの分子を用いた構造的相補システムの基盤として使用されました。このシステムにおいて、LgBiT サブユニットは単独ではほとんど活性がありませんが、11 アミノ酸ペプチドと結合することで酵素相補性が引き起こされ、それにより NanoLuc®ルシフェラーゼ活性がほぼ完全に回復します (1)。Small BiT (SmBiT) と呼ばれるこの低親和性ペプチドは、単独では LgBiT と容易に相互作用しないため、NanoBiT® PPI System を用いた融合パートナーのタンパク質間相互作用の研究に使用できます。対照的に、HiBiT ペプチドは高い親和性 (約 1 nM) で LgBiT と自然に結合します。



## 6.A. Nano-Glo® HiBiT Extracellular Assay の概要 (続き)

したがって、HiBiT はサイズが小さくタンパク質機能に対する影響が小さいため、タンパク質のタグとして最適です。HiBiT が Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent に含まれる過剰量の LgBiT タンパク質に高い親和性で結合することにより、HiBiT タグはタンパク質発現レベルを定量するための明るい発光酵素になります。

Nano-Glo® HiBiT Extracellular Detection System は、生細胞の非溶解アッセイフォーマットで細胞非透過性 LgBiT タンパク質にアクセス可能な HiBiT タグを迅速に定量するためにデザインされました。明るいシグナルで内因性発現レベルの様々なタンパク質を定量でき、7 桁のダイナミックレンジで大量に過剰発現されたタンパク質も確実に定量できます (図 2、3、5)。HiBiT シグナルは安定で、一般的なシグナル半減期は 1~2.5 時間です ( [条件に依存]、図 6)。Nano-Glo® HiBiT Extracellular Detection System は細胞表面あるいは分泌された HiBiT タグ付きタンパク質を測定し、Nano-Glo® HiBiT Lytic Detection System はサンプルに含まれる HiBiT タグ付きタンパク質の総量を定量します (カタログ番号 N3030、N3040、N3050)。さらに、HiBiT タグ付きタンパク質は Nano-Glo® HiBiT Blotting System (カタログ番号 N2410) を用いて SDS-PAGE 後にメンブレン上で検出することもできます。

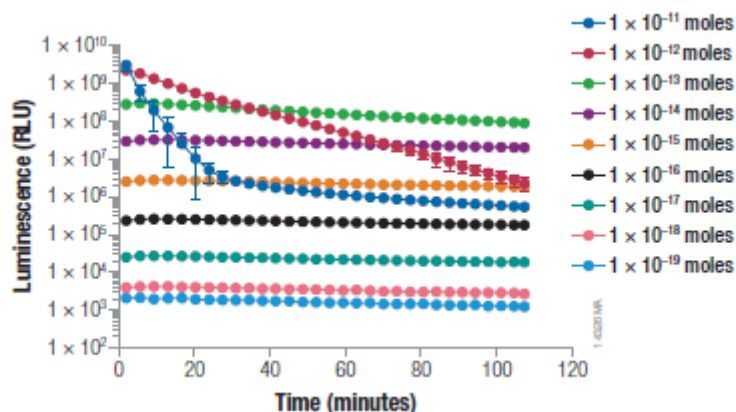


図 6. Nano-Glo® HiBiT Extracellular Assay のシグナル減衰動態。図 2 の精製済み HaloTag®-HiBiT の滴定におけるシグナル減衰動態を示しています。エラーバーは n=4 の標準偏差を表しています。

## 6.B. 目的のタンパク質への HiBiT の付加

### マルチクローニングサイト (MCS) ベクター

目的の遺伝子 (GOI) は標準的なクローニングプロトコールに従って HiBiT を持つベクター pBiT3.1-N [CMV/HiBiT/Blast]、pBiT3.1-C [CMV/HiBiT/Blast]、および pBiT3.1-secN [CMV/HiBiT/Blast] に導入することができます。図 7 は、各ベクターの MCS に含まれる特有の制限酵素サイトを示しています。XhoI サイトおよび SacI サイトは、POI を HiBiT タグと融合させる Gly/Ser リンカー内に存在します。XhoI サイトは標準的な 8 Gly/Ser リンカーを導入するために使用でき、SacI サイトは最小のリンカー (Gly-Ser-Ser-Gly) を導入する際に使用できます。その他の制限酵素サイトを使用するとより長いリンカー配列が得られます。リンカーやネイティブシグナル配列後の HiBiT タグ付加に関する詳細情報は、「他の発現ベクターへの HiBiT の付加」のセクションをご覧ください。HiBiT コード配列を変えず、HiBiT が Nano-Glo® 検出試薬と併用される限り、これらのベクターから HiBiT タグや ORF を他の発現系へと移し換えることができます。

表 1 は、HiBiT タグに最も近い 4 つの制限酵素サイトをそれぞれ選んで、異なるリンカー長が得られた場合に生成される融合タンパク質のリストです。PCR プライマーをデザインするには、表 2 に記載されるヌクレオチド配列を組み入れて正しいインフレームのタンパク質とリンカー配列を発現させます。pBiT3.1-N [CMV/HiBiT/Blast] Vector と pBiT3.1-secN [CMV/HiBiT/Blast] Vector の場合、3'プライマーに終止コドンが含まれるようにします。pBiT3.1-C [CMV/HiBiT/Blast] Vector の場合、5'プライマーに開始コドン ATG が含まれるようにします。これらのベクターは、バクテリアのカナマイシン耐性遺伝子および哺乳類細胞のブラストサイジン耐性遺伝子を持っています。pBiT3.1-secN [CMV/HiBiT/Blast] Vector には、HiBiT タグと POI の前に IL-6 シグナル配列 N 末端が含まれており、タンパク質の効率的な分泌または細胞膜ターゲティングが促進されます。pBiT3.1-secN [CMV/HiBiT/Blast] Vector の場合、切断されるネイティブシグナル配列に続く残基で始まるように 5'PCR プライマーをデザインします。こうすることで、ネイティブシグナル配列は強力な IL-6 シグナルに置き換えられ、これがシグナルペプチドの切断後、N 末端に HiBiT を持つ成熟タンパク質を残します。

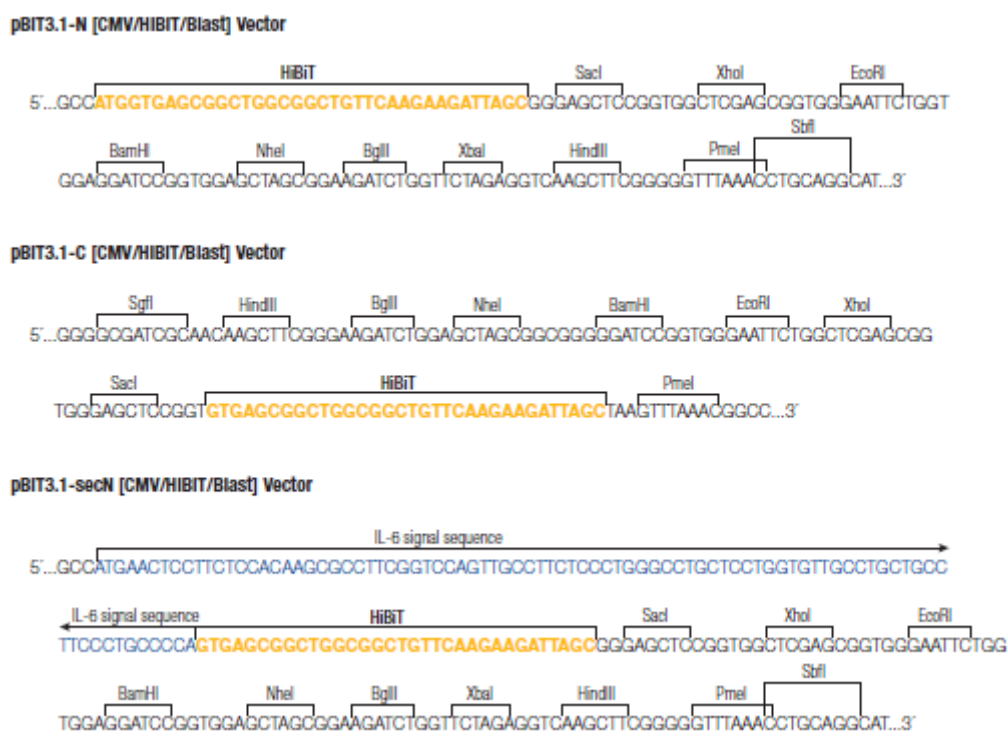


図 7. MCS エントリーベクターにおいて使用可能な制限酵素サイト

6.B. 目的のタンパク質への HiBiT の付加 (続き)

表 1. pBiT3.1 Vectors の SacI, XhoI, EcoRI, または BamHI サイトと関連するリンカー配列。

HiBiT Entry Vector	Fusion Protein	MCS Restriction Site
pBiT3.1-N [CMV/HiBiT/Blast] Vector	HiBiT-GSSG-POI	SacI
	HiBiT-GSSGSSG-POI	XhoI
	HiBiT-GSSGSSGGNS-POI	EcoRI
	HiBiT-GSSGSSGGNSGGGS-POI	BamHI
pBiT3.1-C [CMV/HiBiT/Blast] Vector	POI-GSSG-HiBiT	SacI
	POI-GSSGSSG-HiBiT	XhoI
	POI-GNSGSSGGSSG-HiBiT	EcoRI
	POI-GSGGNSGSSGGSSG-HiBiT	BamHI
pBiT3.1-secN [CMV/HiBiT/Blast] Vector	IL6-HiBiT-GSSG-POI	SacI
	IL6-HiBiT-GSSGSSG-POI	XhoI
	IL6-HiBiT-GSSGSSGGNS-POI	EcoRI
	IL6-HiBiT-GSSGSSGGNSGGGS-POI	BamHI

表 2. pBiT3.1 Vectors の MCS に含まれる制限酵素サイトのプライマー配列。

HiBiT Entry Vector	Restriction Site	Primer Sequence
pBiT3.1-N [CMV/HiBiT/Blast] Vector	SacI	5'-NNNNNNGAGCTCCGGT(GOI)-3'
	XhoI	5'-NNNNNNCTCGAGCGGT(GOI)-3'
	EcoRI	5'-NNNNNNGAATTCT(GOI)-3'
	BamHI	5'-NNNNNNGGATCC(GOI)-3'
pBiT3.1-C [CMV/HiBiT/Blast] Vector	SacI	5'-NNNNNNGAGCTCCC(RC GOI)-3'
	XhoI	5'-NNNNNNCTCGAGCC(RC GOI)-3'
	EcoRI	5'-NNNNNNGAATCCC(RC GOI)-3'
	BamHI	5'-NNNNNNGGATCC(RC GOI)-3'
pBiT3.1-secN [CMV/HiBiT/Blast] Vector	SacI	5'-NNNNNNGAGCTCCGGT(GOI)-3'
	XhoI	5'-NNNNNNCTCGAGCGGT(GOI)-3'
	EcoRI	5'-NNNNNNGAATTCT(GOI)-3'
	BamHI	5'-NNNNNNGGATCC(GOI)-3'

5'末端の N ヌクレオチドは、確実に効率的な制限酵素消化を行うために付加する 5~10 個の塩基を表しています。  
GOI= 目的の遺伝子、RC GOI= 目的の遺伝子の逆相補鎖

## Flexi® Entry Vector

Flexi® Vector System では、N 末端や C 末端に融合させるために複数の Flexi® Vector 間でタンパク質コード配列を持つ単一の DNA インサートを迅速に移し換えることができます。Flexi® Vector Systems Technical Manual (#TM254) に記載の指示に従ってタンパク質コード配列を pFC37K HiBiT Vector、pFN38K HiBiT Vector、または pFN39K secHiBiT CMV-neo Flexi® Vector にクローニングします。Flexi® Vector には汎用される致死遺伝子 barnase が含まれており、目的のクローンを生存させるにはこれをインサートに置き換えなければなりません。この致死性により、ベクターバックボーン間でタンパク質コード領域を高い効率で確実に移し換えることができます。barnase 遺伝子を置換せずに、プラスミド増殖やタンパク質発現で一般的に使用される菌株において Flexi® Vector を増殖させることは不可能です。HiBiT Flexi® Vector は、バクテリアのカナマイシン耐性遺伝子および哺乳類細胞のプラスサイン耐性遺伝子を持っています。pFN39K secHiBiT CMV-neo Flexi® Vector には、タンパク質の効率的な分泌または細胞膜ターゲティングのために、HiBiT および POI の前に IL-6 シグナル配列 N 末端が含まれています。このベクターの PCR プライマーをデザインする際、HiBiT タグが成熟タンパク質の N 末端に付加されるようにネイティブシグナル配列は除去します。HiBiT コード配列を変えず、HiBiT が Nano-Glo®検出試薬と併用される限り、これらのベクターから HiBiT タグや ORF を他の発現系へと移し換えることができます。

PCR 産物を Flexi® Vectors へクローニングする方法にはいくつかのオプションがあります：

- ・ HiBiT を N 末端に付加する場合 (pFN38K HiBiT Vector および pFN39K secHiBiT CMV-neo Flexi® Vector)、TM254 のセクション 4 に記載されるプロトコールに従います。
- ・ HiBiT を C 末端に付加する場合 (pFC37K HiBiT CMV-neo Flexi® Vector)、TM254 のセクション 4.B のステップ 2 でアクセプターである Flexi® Vector を消化する際に、代わりにセクション 5.B のステップ 3 の Flexi® Vector 消化プロトコールを使用します。Carboxy Flexi® Enzyme Blend は、アクセプター Flexi® Vector の C 末端に付加する場合にのみ使用します。
- ・ まずタンパク質コード配列を pF4A CMV Flexi® Vector (カタログ番号 C8481) にクローニングし、配列を確認後、ORF を HiBiT Flexi® Vector に移し換えます。

PCR プライマーをデザインする際、SgfI 認識サイトと開始コドンの間には 1 塩基を追加するようにしてください。インサートを C 末端融合に使用する場合、タンパク質コード領域の最後に停止コドンを入れてはいけません (TM254 のセクション 9.A を参照)。

弊社の Flexi ORF Clone リソース ([www.promega.co.jp/flexiclone/index.html](http://www.promega.co.jp/flexiclone/index.html)) には、ドナーの Flexi® DNA として使用できるかずさ DNA 研究所提供のすぐ使えるコンストラクトが 10,000 近く含まれています。かずさ DNA 研究所から得られたすべてのコンストラクトは PCR 不要で直接 HiBiT Flexi® Vectors に移し換えることができます。

表 3. HiBiT Flexi® Vectors と関連付けられているリンカー配列。

Vector Name	Fusion Protein
pFC37K HiBiT CMV-neo Flexi® Vector	POI-VSQGSSGGSSG-HiBiT
pFN38K HiBiT CMV-neo Flexi® Vector	HiBiT-GSSGGSSGAIA-POI
pFN39K secHiBiT CMV-neo Flexi® Vector	IL6-HiBiT-GSSGGSSGAIA-POI

## 6.B. 他の発現ベクターへの HiBiT の付加 (続き)

### 他の発現ベクターへの HiBiT の付加

HiBiT タグは、PCR を用いた方法や遺伝子合成法により既存のタンパク質発現コンストラクトに直接付加できます。HiBiT タグを合成する権利は、以下のサイトの「Terms and Conditions of Use (使用条件)」を確認・承諾していただくことで取得いただけます( [www.promega.co.jp/nanobitsynthesis/](http://www.promega.co.jp/nanobitsynthesis/) )。HiBiT タグは、ペプチド配列を変えず、HiBiT が NanoGlo® 検出試薬と併用される限り、あらゆる発現系へと移し換えることができます。

HiBiT 発現コンストラクトをデザインする際、目的のタンパク質と HiBiT との間のリンカーのサイズを小さくしたり、排除したりすることもできます。様々なタンパク質に融合した HiBiT タグが確実にアクセスできる状態にするために、8 残基の Gly/Ser リンカーを使用しています。しかしながら、ほとんどの場合ではリンカーを 2~3 残基に短縮したり、完全になくした場合でも HiBiT タグの機能は大幅には損なわれないことを確認しています。目的のタンパク質に成熟タンパク質から切断される N 末端シグナル配列がある場合、HiBiT タグをシグナル切断サイトの直後に配置して成熟タンパク質の N 末端に HiBiT を融合させることができます。

場合によっては、HiBiT タグをタンパク質のいずれかの末端ではなくタンパク質内部にうまく挿入できる場合もあります。内部の HiBiT タグが効果的に LgBiT と相補 (結合) するかどうかは、主にそのアクセスのしやすさに左右され、タンパク質構造とタグ配置により異なります。HiBiT タグは、内部に配置される場合、効率的な相補には拡張した立体構造を取ることが必要となるため、HiBiT のいずれかの端にリンカー配列が必要になることがあります。HiBiT を小さなループに配置すると、立体構造のゆがみが発生し、シグナル強度が低下する可能性があります。一般的に、内部タグからのシグナルは多少低下しており、LgBiT との平衡化に時間がかかります。内部タグ付けタンパク質を初めて使用する場合には、試薬添加後 3 時間までは発光をモニタリングして、測定に最適なインキュベーション時間を決定することをおすすめします。

### 内在性遺伝子座における HiBiT の CRISPR/Cas9 ノックイン

HiBiT はサイズが小さく明るいいため、タグを内在性遺伝子座に導入 (ノックイン) するための CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集に最適なタグとなります。HiBiT から発生する明るい発光により、内因性レベルで発現したタンパク質の測定が容易になります。内在性タンパク質を HiBiT でタグ付けすることで、過剰発現によるアーチファクトが発生せず、生理学的に関連性のある生物学的応答をより多く観察することができます (図 3 および図 4 を参照)。

HiBiT 配列はわずか 33 ヌクレオチド長であるため、HiBiT タグを挿入するための相同組換え修復を一本鎖 DNA オリゴヌクレオチドで行うことができ、DNA コンストラクトの作製が不要になります。ガイド DNA (gDNA) と Cas9 タンパク質を持つリボ核タンパク質粒子 (RNP) をドナー ssDNA と共に細胞内へエレクトロポレーションで導入して HiBiT を

高い効率で挿入することができます。この挿入の結果は、Nano-Glo® HiBiT Extracellular Detection System により 1~2 日で測定できます (5)。HiBiT を内在性タンパク質に付加するための CRISPR/Cas9 の使用についての詳細情報はプロメテックテクニカルサービスにお問い合わせください。HiBiT タグをドナー ssDNA 上で合成する権利は、以下のサイトの「Terms and Conditions of Use (使用規約)」を確認・承諾していただくことで取得していただけます ([www.promega.co.jp/nanobitsynthesis/](http://www.promega.co.jp/nanobitsynthesis/))。

### 6.C. アッセイパフォーマンスに対する発現レベルの影響

発現レベルの変化は、主に酵素シグナル動態と観察される生物学的応答という 2 つの形でアッセイパフォーマンスに影響を与えます。Nano-Glo® HiBiT Extracellular Detection System では、幅広い濃度範囲にわたりグロー型発光シグナルが維持され、十分に混和されたサンプルではシグナル半減期が 1~2 時間になります。しかしながら、シグナル半減期は HiBiT が極度に高濃度の場合には著しく低下することがあり、その原因としては基質の急激な枯渇が考えられます (図 6 を参照)。この範囲のサンプルでは、低濃度のサンプルと同程度の経時的な相対的光出力レベルが維持されません。サンプルの HiBiT 濃度が極度に高い可能性が疑われる場合には、Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent の添加後、シグナル減衰速度を経時的にモニタリングします。急激な基質枯渇を引き起こす HiBiT 濃度は通常、96 ウェルフォーマットの検出で使用されるルミノメーターのリニアダイナミックレンジに近いが、これを上回っています。

これとは逆に、HiBiT が超微量の場合、シグナルが試薬バックグラウンドに近くなるため測定が難しくなります。これによりウェル間のばらつきが増大する可能性があります。このような状況では、得られる値が HiBiT 濃度に比例するようにバックグラウンド発光を差し引く必要があります。細胞と培地はいずれもバックグラウンドに影響を与えるため、適切なバックグラウンドコントロールは、HiBiT タグ付きタンパク質を発現しない細胞を同じ培地で増殖させたものとなります。アッセイバックグラウンド近くで感度を最大限にする方法についての詳細情報はセクション 6.H および 6.I をご覧ください。

HiBiT タグ付きタンパク質が本来の内在性タンパク質と同じ挙動を示すために、正確な測定に十分に高いシグナルを維持しながら、タンパク質は低レベルで発現させます。タンパク質が非常に高レベルで発現すると、内在性結合パートナーに対する化学量または調節機構の変化により不適切に制御されることになる可能性があります。図 3 および図 4 は、HiBiT タグ付きタンパク質の過剰発現が高まることで処理に対する応答 (fold response) がいかに低下するかを示しています。対照的に、HiBiT タグの CRISPR/Cas9 ノックインを用いて内在性レベルでタンパク質を発現することにより非常に良好な応答が得られるようになりますが、これは内在性タンパク質に対する適切な化学量が維持されるからであると考えられます。

HiBiT/LgBiT 複合体は明るいため、通常、タンパク質は内在性レベルでモニタリングできます。CMV のような強力なプロモーターより HiBiT タグ付きタンパク質を発現する DNA コンストラクトを一過性トランスフェクションする場合には、DNA コンストラクトをキャリア DNA (Transfection Carrier DNA [カタログ番号 E4881] など) で 1000 倍以上に希釈することをおすすめします。トランスフェクションに最適な DNA 量は、使用する細胞の種類およびトランスフェクション効率により異なります。発現コンストラクトを少量でトランスフェクションすることは、高レベルの酵素により急激に基質が枯渇したり、ルミノメーターの直線検出範囲を超えたりしないようにするのに有用です。さらに重要なこととして、発現コンストラクトを希釈するという事は、生物学的に適切に制御されるためにタンパク質がより生理学的レベ

ルに近い存在量で発現されるということを意味します。しかしながら、CMV 発現コンストラクトの希釈ではすべての細胞で均一な低い発現レベルが達成されず、むしろ発現レベルの分布を低下させ、広げる傾向があります。そのため、発光の大部分はタンパク質を高レベルで発現する少数の細胞に由来している可能性があります。HiBiT タグ付きタンパク質をより均一で低レベルに発現させるためには、以下の方法を取ることができます：1) TK や PGK などの弱いプロモーターまたは CMV を欠失させた発現コンストラクトを一過性トランスフェクションさせる、2) CMV 発現コンストラクトを安定トランスフェクションさせ、発現レベルの低いクローンを選択する、または 3) タンパク質の内在性遺伝子座に HiBiT タグを付加するために CRISPR/Cas9 を使用する。

#### 6.D. HiBiT コンストラクトのトランスフェクション

以下のプロトコールは、CMV プロモーターを用いて HiBiT タグ付きタンパク質を発現させるコンストラクトを 96 ウェルプレートで一過性トランスフェクションする場合に推奨されます。プレーティング前に細胞を脂質および DNA と混合する方法やバルクトランスフェクション、リプレーティングなど別のプロトコールも使用できますが、ここでは取り上げません。セクション 6.C で記載したように、HiBiT アッセイの最適化では簡単に測定できるシグナルと予測される生物学的応答の両方を達成する発現レベルを決定することが必要になるかもしれません。一般的に使用されている培養細胞では、CMV 発現コンストラクトを 1 ウェルあたり 0.5 ng または 0.05 ng の濃度でトランスフェクションすることをおすすめします。以下のプロトコールは、1 ウェルあたり 5~0.005 ng の濃度で発現コンストラクトをトランスフェクションするためにキャリア DNA で発現コンストラクトを希釈する方法です。弱いプロモーターを持つコンストラクトの場合、DNA を増量して最適化することができるかもしれません。

1. 白色の 96 ウェル組織培養プレート（例：Corning カタログ番号 3917）にウェルあたり全量 100  $\mu$ L の細胞を入れます。
2. 37°C、5% CO<sub>2</sub> のインキュベーターで 16~24 時間インキュベートして細胞を付着させます。
3. Transfection Carrier DNA (カタログ番号 E4881) および HiBiT 発現コンストラクトを Opti-MEM® I Reduced Serum Medium (Life Technologies カタログ番号 11058) でそれぞれ 6.25 ng/ $\mu$ l に希釈します。
4. 下の表に記載されるように、6.25 ng/ $\mu$ l の Transfection Carrier DNA 溶液で発現コンストラクトを段階希釈します。

Tube number	Dilution	Expression Construct Transfected/Well
1	1/10 dilution of 6.25ng/ $\mu$ l construct	5ng
2	1/10 dilution of Tube #1	0.5ng
3	1/10 dilution of Tube #2	0.05ng
4	1/10 dilution of Tube #3	0.005ng

5. 目的の細胞種に適した脂質：DNA 比で FuGENE® HD Transfection Reagent または ViaFect™ Transfection Reagent を添加します。室温で 10 分間インキュベートします。

**注記：**推奨される脂質：DNA 比については、FuGENE® HD データベース ([www.promega.com/resources/tools/fugene-hd-protocoldatabase/](http://www.promega.com/resources/tools/fugene-hd-protocoldatabase/)) をご参照ください。

6. 脂質：DNA 混合物 8  $\mu$ L を各ウェルに添加します。プレートを 2~3 秒間手で回して混和させます。
7. プレートを 37°C、5% CO<sub>2</sub> のインキュベーターで 20~24 時間インキュベートします。

## 6.E. 培地除去と 1×Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent 添加の代替プロトコール

付着細胞から培地を除去し、1×Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent で置換することは、以下の場合に有用です：

- ・ シグナルがアッセイバックグラウンドに近く、シグナル/バックグラウンド比を高くすることが求められる場合（セクション 6.H および 6.I を参照）。
- ・ 細胞表面での発現を測定する前に培地に含まれる 1 つ以上の成分（受容体アゴニストなど）を除去することが必要である場合。

1. セクション 3.B の記載に従って Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent を調製します。
2. 調製した試薬に PBS などの最小限の緩衝液が含まれる生理食塩溶液を等量加え、転倒混和します。これが 1×reagent となります。
3. HiBiT タグ付きタンパク質を発現する哺乳動物細胞を含むプレートを 37°C インキュベーターから取り出します。
4. 付着細胞に影響を与えたり乾燥させたりせずに（吸引などの手段で）各ウェルから培地を除去します。
5. プレートのウェルに 1×reagent を適量加えます。一般的に、元のサンプル量の 1~2 倍の量の 1×reagent を加えることをおすすめします。
6. 室温で 10 分間インキュベートして LgBiT と HiBiT を平衡化させます。HiBiT タグがタンパク質配列内にある場合、タンパク質末端にタグがある場合と比べて長いインキュベーション時間が必要になる場合があります。お使いの装置の設定を用いて室温で発光を測定します。GloMax® 装置で 96 ウェルプレートを使用する場合、測定時間 (integration time) は 0.5~2 秒が推奨されます。測定時間を延長すると、発現レベルが低い場合のデータクオリティが改善される可能性があります。発光強度は一般的に、シグナル半減期 1~2.5 時間で減衰します。

### 備考：

1. 1×reagent の添加後、プレートを 37°C で 10 分間インキュベーションしてから 37°C ルミノメーターで発光を測定することもできます。
2. HiBiT が細胞表面タンパク質に融合されていない場合であっても、培地交換または細胞洗浄によりすべての細胞外 HiBiT シグナルを除去することは困難であるかもしれません。これについては多数の潜在的な原因が考えられ、例えば透過性膜を持つ死細胞や損傷細胞の存在、細胞の外側に結合したままになっているタンパク質、または別の形でプレートと結合したままになっているタンパク質などがあります。誘導性発現系は細胞処理前に細胞外蓄積を低減させることでこのようなタンパク質バックグラウンドを低下させる可能性があります。



## 6.F. リアルタイム測定のための代替プロトコール

場合によっては、細胞外 HiBiT レベルの変化を単一エンドポイントで測定するのではなく経時的に測定することが必要になるかもしれません。例えば、タンパク質の輸送や分泌速度の変化は規定の培地で 1~2 時間の間にわたり測定することができます。以下のプロトコールは、Nano-Glo® HiBiT Extracellular Buffer の代わりに細胞培養培地で作製された 1× reagent を加える方法です。

1. 適量の HEPES 緩衝培地をプレートに入っている培地と交換します。これは通常、全ウェルに含まれる培地の総量に分注に要する追加分を足した量となります。シグナル/バックグラウンド比とシグナル安定性を最適化するために、培地に添加する血清量は最小限に抑えます（セクション 6.H および 6.I を参照）。
2. 未使用の容器に適量の培地で LgBiT Protein を 1 : 200、Nano-Glo® HiBiT Extracellular Substrate を 1 : 100 に希釈し、転倒混和させて 1× reagent を作製します。例：1× reagent の必要量が 4 mL の場合、緩衝培地 4 mL をディスプレイ容器に移し、LgBiT Protein を 20  $\mu$  L、Nano-Glo® HiBiT Extracellular Substrate を 40  $\mu$  L 加えます。  
**備考：**分注直前に試薬を 37°C に温めることは通常は不要であり、温めることで試薬安定性に悪影響を及ぼすこととなります。
3. HiBiT タグ付きタンパク質を発現する哺乳動物細胞を含むプレートを 37°C インキュベーターから取り出します。
4. 付着細胞に影響を与えたり乾燥させたりせずに（吸引などの手段で）各ウェルから培地を除去します。

## 6.F. リアルタイム測定のための代替プロトコール（続き）

5. プレートのウェルに 1× reagent を適量加えます。一般的に、元のサンプル量の 1~2 倍の量の 1× reagent を加えることをおすすめします。
6. 目的の温度（通常、37°C または室温）に設定したルミノメーターにプレートを装着し、必要な時間（最長 2 時間）にわたる発光を測定します。一般的に、10~15 分後にはプレート温度は安定し、LgBiT と HiBiT は平衡化しています。この時点の後に発生するシグナル変化は、細胞外 HiBiT タグ付きタンパク質レベルの変化と酵素-基質系の自然なシグナル減衰速度の変化の組み合わせによるものです。HiBiT レベルの変化を経時的に定量するには、HiBiT タグ付きタンパク質の量が変化しないコントロールウェルに対してノーマライズしてこのシグナル減衰を考慮に入れます。

### 備考：

1. HiBiT タグ付きタンパク質の細胞内位置から細胞外位置への輸送速度を測定する場合、 $t=0$  をシグナル平衡化後の最初の時点として設定することをおすすめします。これは通常、試薬添加から 10~15 分後です。この値をその後の測定値から引くことで、実験測定中に細胞表面へと輸送された HiBiT タグ付きタンパク質からのシグナルが得られます。シグナル減衰を把握するため、実験値のノーマライゼーションのために細胞外 HiBiT タグ付きタンパク質を一定量で含むサンプルを含めます。
2. 場合によっては、事前に LgBiT を結合することで HiBiT タグ付きタンパク質のインターナリゼーションをリアルタイムで測定できます。リアルタイム測定用プロトコールに従って、シグナルを平衡化させ、インターナリゼーション

を促進する受容体アゴニストまたはその他の化合物を添加した後、溶媒コントロールに対するシグナルの変化をモニタリングすることをおすすめします。LgBiT は HiBiT タグ付きタンパク質と共にインターナリゼーションすることが予想され、furimazine 基質も細胞透過性であるため、この複合体は多くの場合、インターナリゼーションの際に活性が大幅に低下することが確認されます。これによりインターナリゼーションのリアルタイム測定が実現します。発光値を化合物添加前の値（または直近数回分の測定値の平均値）で割ってウェルあたりでノーマライズすることは、細胞数、発現レベル、またはその他の要因が原因のばらつきを低減するのに効果的です。ウェルあたりの応答（fold response）を算出することで、細胞表面発現のわずかな変化を正確に測定できます。

3. 特定の状況下では、LgBiT Protein を細胞とインキュベートする時間を延長し、終点測定直前に基質を添加することが必要になるかもしれません。例えば、平衡化時間の延長が必要な内部 HiBiT タグを含むタンパク質の輸送を測定する場合、実験開始時に LgBiT を含み基質は含まない培地で細胞培地を置換します（例：100 倍希釈の LgBiT Protein が含まれる HEPES 緩衝培地を等量）。必要な時間経過後、LgBiT を含まない 2×reagent（基質を Nano-Glo® HiBiT Extracellular Buffer で 50 倍希釈したもの）を等量加え、混和させ、セクション 3.C のステップ 4 に従って 10 分後の発光を測定します。
4. HiBiT が細胞表面タンパク質に融合されていない場合であっても、培地交換または細胞洗浄によりすべての細胞外 HiBiT シグナルを除去することは困難であるかもしれません。これについては多数の潜在的な原因が考えられ、例えば透過性膜を持つ死細胞や損傷細胞が存在すること、細胞の外側に結合したままになっているタンパク質、または別の形でプレートと結合したままになっているタンパク質などがあります。誘導性発現系は細胞処理前に細胞外蓄積を低減させることでこのようなタンパク質バックグラウンドを低下させる役に立つ可能性があります。

## 6.G. 細胞外 HiBiT シグナルと溶解 HiBiT シグナルの比較

細胞表面上あるいは培地に分泌された HiBiT タグ付きタンパク質の量を測定する際、サンプルに含まれる細胞外タンパク質量と総タンパク質量の比率について興味を持つかもしれません。これは細胞外タンパク質レベルの変化が輸送効率の変化によるものなのか、タンパク質の発現や分解によるものなのかを判断する上で特に重要です。細胞外 HiBiT シグナルと全 HiBiT シグナルを両方測定するには、複製ウェルに細胞溶解試薬を追加する、または細胞外側測定後に界面活性剤を添加して同じウェル内でマルチプレックス定量する 2 つの方法が考えられます。

### 複製ウェルにおける Nano-Glo® HiBiT Lytic Reagent と Extracellular Reagent の比較

Nano-Glo® HiBiT Lytic Detection System（カタログ番号 N2030、N2040、N2050）はサンプルに含まれる HiBiT タグ付きタンパク質の全量を測定するのに最適な方法です。Extracellular Reagent と Lytic Reagent を複製ウェルに添加し、Technical Manual（TM516）のセクション 3.C に記載されるプロトコールに従って、水平に振とうして混和させ、10 分後に発光を測定します。さまざまな培地と組み合わせられたバッファー条件の違いにより、各試薬では特定量の HiBiT から異なる量の光が発生します。このようなシグナルの明るさの違いは、HiBiT Control Protein（カタログ番号 N3010）などの 100%細胞外の HiBiT タグ付きタンパク質をアッセイ培地で希釈したもの（例えば 100 pM）から得られるシグナルを比較することで補正できます。

実験サンプルに含まれる HiBiT タグ付きタンパク質の細胞外面分を測定するには、Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent および Lytic Reagent を以下の種類のサンプルが含まれる複製ウェルに添加します：

1. “バックグラウンド”：HiBiT を発現しない非トランスフェクション細胞
2. “テスト”：HiBiT タグ付きタンパク質を発現する実験細胞
3. “コントロール”：100%細胞外 HiBiT（培地中の HiBiT Control Protein）

“テスト”サンプルに含まれる細胞外タンパク質の画分は、“バックグラウンド”を引いた細胞外測定値と溶解測定値の比を算出し、細胞外試薬の場合と比較した溶解試薬に含まれる“コントロール”サンプル（100%細胞外 HiBiT）のシグナルにおける倍率変化（fold difference）を掛けて決定します：

$$\left[ \frac{(\text{細胞外 “テスト”} - \text{細胞外 “バックグラウンド”})}{(\text{溶解 “テスト”} - \text{溶解 “バックグラウンド”})} \right] \times \left[ \frac{(\text{溶解 “コントロール”} - \text{溶解 “バックグラウンド”})}{(\text{細胞外 “コントロール”} - \text{細胞外 “バックグラウンド”})} \right]$$

例：目的の HiBiT タグ付きタンパク質（POI）のトランスフェクション細胞からの分泌の程度は、Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent と Lytic Reagent 中でのシグナルを比較することで調べられています。非トランスフェクション細胞および培地中の精製済み HiBiT Control Protein も比較のためにプレートに含められており、以下の発光データが得られます：

Sample	Extracellular Signal (RLU)	Lytic Signal (RLU)
Untransfected cells	$6 \times 10^3$	$1 \times 10^3$
Cells transfected with POI-HiBiT	$2 \times 10^5$	$3 \times 10^6$
HiBiT Control Protein	$2 \times 10^7$	$1 \times 10^7$

$$\frac{(2 \times 10^5 - 6 \times 10^3)}{(3 \times 10^6 - 1 \times 10^3)} \times \frac{(1 \times 10^7 - 1 \times 10^3)}{(2 \times 10^7 - 6 \times 10^3)}$$

$0.0647 \times 0.500 = 0.0323$ 、つまり POI の 3.2%は分泌されています。

## 6.G. 細胞外 HiBiT シグナルおよび溶解 HiBiT シグナルの比較（続き）

複製ウェルの比較のための Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent への界面活性剤の添加

総 HiBiT タグ付きタンパク質を測定するには Nano-Glo® HiBiT Lytic Reagent を使用することをおすすめしていますが、発光測定値を簡単に比較するために同じバッファー条件で溶解タンパク質測定と細胞外タンパク質測定を実施することも可能です。その場合、調製した Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent に少量の界面活性剤を添加して 2×lytic reagent を作製することができます。

高濃度の界面活性剤は HiBiT シグナルを阻害しますが、シグナル阻害がほとんど発生しない比較的穏やかな界面活性剤条件で多数の細胞内コンパートメントに LgBiT Protein がアクセスできる状態になります。これにより、複製ウェルにおける細胞外タンパク質と総タンパク質の測定値をより直接的に比較することが可能になります。例えば、試薬に 200 μg/mL のジギトニンを追加しても HiBiT シグナルはほとんど阻害されませんが、一般的に LgBiT を細胞質および小胞体などの細胞内コンパートメントに含まれるタンパク質と平衡化するには十分です。

最終濃度の低い Triton® X-100 も通常、HiBiT シグナルを大幅に阻害することなく多数の細胞内コンパートメントを透過処理することができます。例えば、Triton® X-100 の 10% (v/v) 原液を調製済み Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent で 100 倍に希釈し、細胞に対する最終濃度が 0.05% (v/v) になるようにします。

試薬バックグラウンドは界面活性剤の有無により大幅に異なることが多いため、非トランスフェクション細胞を使って各試薬のバックグラウンドを測定します。界面活性剤を追加することでシグナル減衰速度にも影響が及ぶ可能性があるため、コントロールサンプルから得られるシグナルはインキュベーションが長くなるに伴いばらつき始めることがあります。

細胞溶解でジギトニンを使用するプロトコールの例：

1. セクション 3.B のプロトコールに従って必要量の Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent を調製します。半量を別の容器に移して lytic reagent を作製します。
2. 2×溶解試薬を作製するには、ジギトニンを試薬中の最終濃度が 0.2 mg/mL になるように添加します（例：20 mg/mL のジギトニン原液を DMSO [カタログ番号 G9441] で 100 倍希釈）。この濃度は HiBiT シグナルにほとんど影響を与えません。
3. セクション 3.C のプロトコールに従って、細胞外試薬および 2×溶解試薬を同一プレートの複製ウェルに添加します。サンプルにはバックグラウンドを測定するための非トランスフェクション細胞、そして HiBiT Control Protein などの 100%細胞外のコントロールサンプルを含めます。
4. 前のセクション「細胞外 HiBiT シグナルと溶解 HiBiT シグナルの比較。」で説明した方法で細胞外タンパク質画分を測定します。この濃度のジギトニンで 100%細胞外コントロールのシグナルが変化しない場合、その後のプレートではノーマライゼーションが不要であるかもしれません。

#### 同一ウェルにおける細胞外測定と溶解測定のマルチプレックス

調べている目的のタンパク質およびその細胞内局在化によっては、連続的な細胞外側定と溶解測定を同一ウェルで行うことができます。このアプローチでは、セクション 3.C のプロトコールを用いて Nano-Glo® HiBiT Extracellular Detection System を実施します。室温で 10 分間インキュベートし、細胞外シグナルを測定した後、界面活性剤の濃縮原液を各ウェルに添加して細胞を溶解します。サンプルを混和させて 10 分以上インキュベートした後、発光を再度測定します。一般に界面活性剤を添加すると試薬バックグラウンドシグナルが変化するため、両方の測定値から試薬バックグラウンドを引き抜きます。2 回の測定間のシグナル減衰のため、100%細胞外コントロールサンプルでは、界面活性剤によるシグナル阻害がなくても、溶解条件下においてシグナルの低下が確認されます。このウェルごとのノーマライゼーションにより実験のばらつきの一部の原因（細胞数や発現レベルなど）は低減しますが、複製ウェルに 2×reagent を添加する場合と比べてウェル間の溶解におけるばらつきが増加する可能性もあります。

膜透過処理を酵素阻害と釣り合わせる際の考慮事項に関する上のセクションをご確認ください。最終濃度が 100  $\mu$ g/mL のジギトニンまたは 0.05% の Triton® X-100 が得られるように 10X または 20X の水溶性界面活性剤原液を添加することで、多くの場合、HiBiT シグナルを大幅に阻害することなく HiBiT タグ付きタンパク質を効果的に遊離させることができます。Mammalian Lysis Buffer (カタログ番号 G9381) は、20X の界面活性剤原液として HiBiT シグナル阻害を最小限に抑えて多数の細胞内コンパートメントを効果的に溶解させるのに最適です。効果的な混和は、完全な細胞溶解を達成しウェル間のばらつきを低減させるのに重要です。HiBiT タグ付きタンパク質の細胞外面分を測定するために、前のセクシ

ョンに記載した分析を実施します。100% 細胞外コントロールは、界面活性剤による HiBiT シグナルの阻害と 2 回の測定間のシグナル減衰の両方を補正するのに役立ちます。

## 6.H. 一般的なアッセイコンポーネントの影響

### 培養培地

Nano-Glo® HiBiT Extracellular Detection System は多くの一般的な培養培地で使用できるようにデザインされていますが、さまざまな培地の成分の違いにより発光シグナルの強度および持続時間が影響を受ける可能性があります (図 8)。このような違いは一般的に小さく、アッセイの有用性を低下させるものではありません。特に注目すべきこととして、培地に含まれるフェノールレッドは光を吸収することにより発光シグナルをわずかに低下させます。Opti-MEM® I Reduced Serum Medium や McCoy's 5A などの一部の培地では、この試薬を使用するとバックグラウンド発光が高くなり、シグナル/バックグラウンド比が低下することがあります。ほぼ同じ条件において比較されるようにするために適切な調整が必要です。

6.H. 一般的なアッセイコンポーネントの影響 (続き)

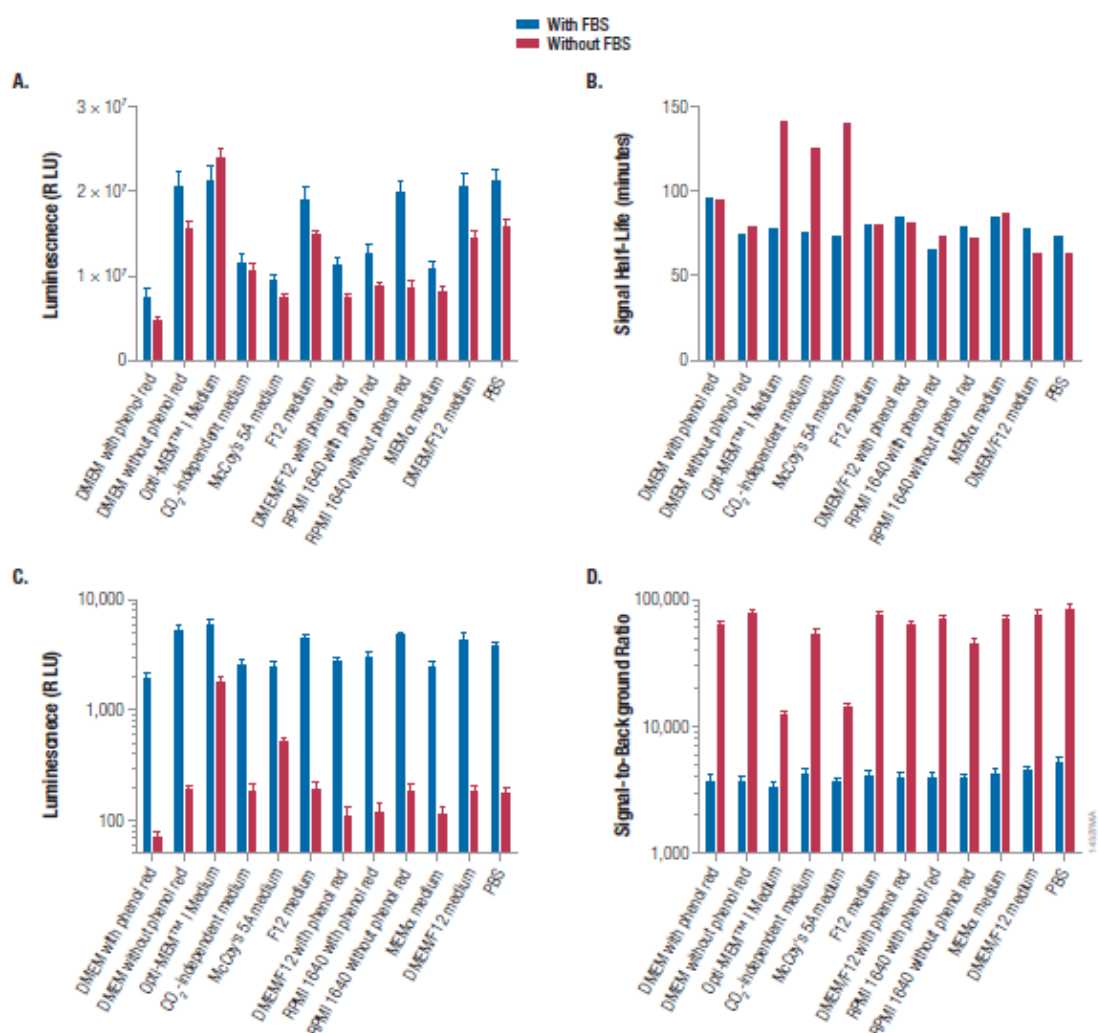


図 8. シグナル強度、シグナル安定性、およびバックグラウンドに対する培地の種類の影響。精製済み HaloTag®-HiBiT タンパク質 (最終濃度 100 pM) は、10%ウシ胎児血清を添加または無添加の条件下でさまざまな細胞培養培地に希釈しました。パネル A : Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent 添加 10 分後に発光を測定しました。パネル B : 2 時間にわたり室温で発光を複数回測定しました。シグナル半減期はデータを単一指数曲線にフィッティングして決定しました。パネル C : HaloTag®-HiBiT タンパク質を含まないさまざまな培地に試薬を添加して試薬バックグラウンドを測定しました。パネル D : 100 pM の HaloTag®-HiBiT タンパク質のシグナル/バックグラウンド比は、10 分後のシグナルを HiBiT なしのバックグラウンド発光で割って算出しました。エラーバーは n=4 の標準偏差を示しています。

## 血清

Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent は、発光シグナルに対する影響が最小限の 0~10%の血清と併用するようにデザインされています (図 9、パネル A)。シグナル半減期は血清によりわずかに低下する可能性があります、発光は 1~2 時間安定です (図 9、パネル B)。血清は HiBiT が不在の場合、試薬発光バックグラウンドを上昇させますが (図 9、パネル C)、これは基質の自己発光が増加し、少量の LgBiT Protein が活性化されるためです。微量の HiBiT タグ付きタンパク質を測定する場合、培地に含まれる血清レベルを下げるのが有用になることがあります (セクション 6.I を参照)。

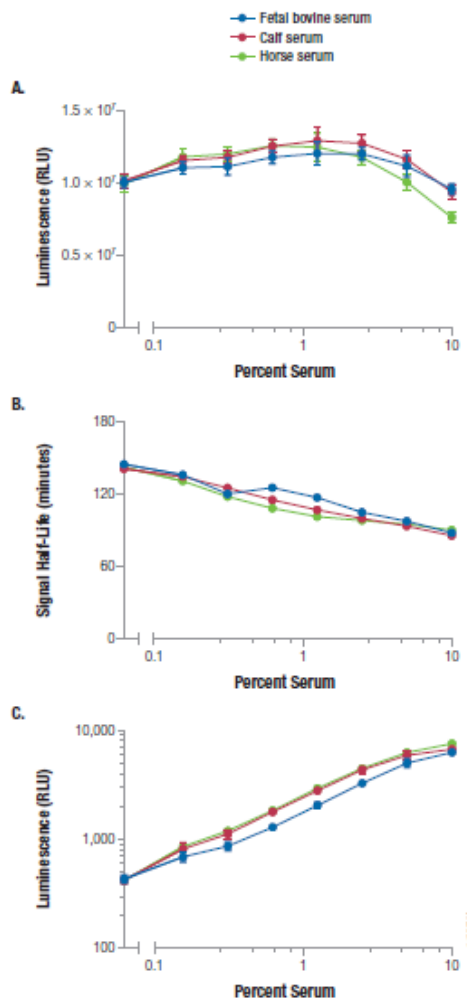


図 9. シグナル強度、シグナル安定性、およびバックグラウンドに対する血清の影響。ウシ胎児血清 (FBS)、仔ウシ血清、またはウマ血清を 0.1 mg/mL BSA キャリアを添加した DMEM で段階希釈しました。パネル A : HaloTag®-HiBiT タンパク質 (100 pM) を血清濃度の異なる培地に希釈し、Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent 添加 10 分後に発光を測定しました。パネル B : 2 時間にわたり室温で発光を複数回測定しました。シグナル半減期はデータを単一指数曲線にフィッティングして決定しました。パネル C : HaloTag®-HiBiT タンパク質非存在下で各濃度の血清に Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent を添加して試薬バックグラウンドを測定しました。エラーバーは n=4 の標準偏差を示しています。

## 有機溶媒

有機溶媒は細胞に添加するために化合物を可溶化する際に使用されるため、アッセイ中に存在している可能性があります。3%までの濃度の DMSO、エタノール、およびメタノールはアッセイの強度、シグナル動態、またはバックグラウンドにほとんど影響を及ぼしません (図 10)。

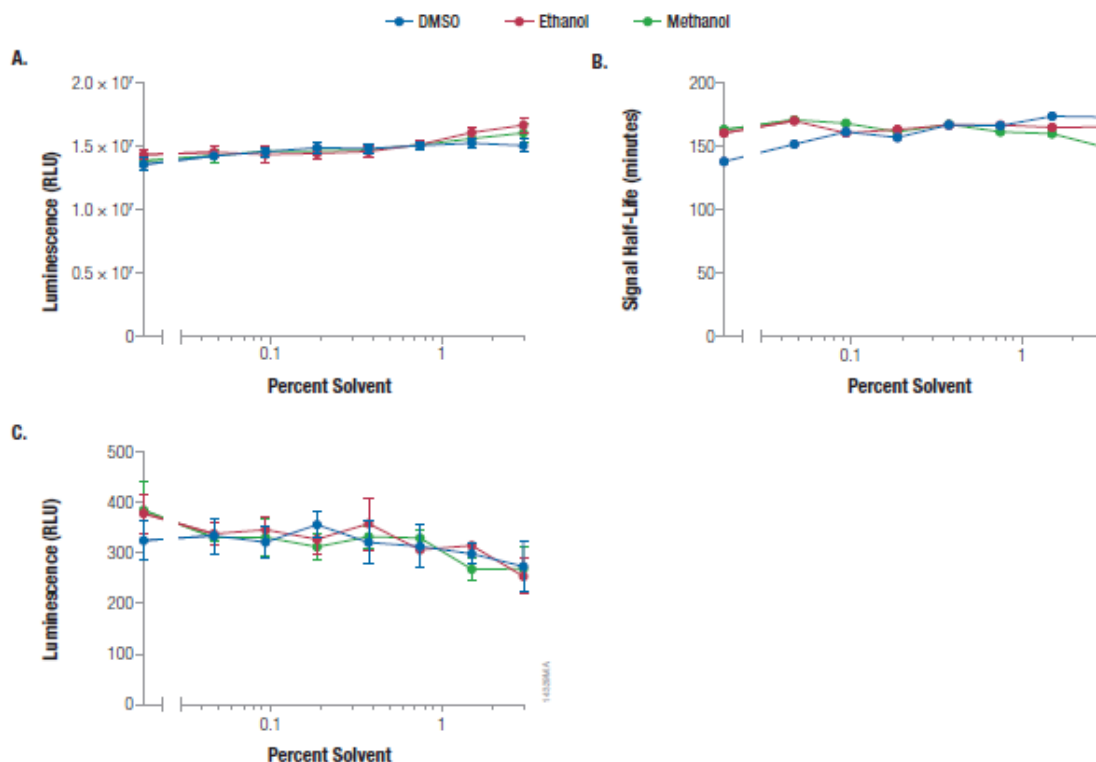


図 10. シグナル強度、シグナル安定性、およびバックグラウンドに対する有機溶媒の影響。

DMSO、エタノール、およびメタノールを 0.1 mg/mL の BSA キャリアを添加した DMEM で段階希釈しました。パネル A : HaloTag®-HiBiT タンパク質 (100 pM) を溶媒濃度の異なる培地に希釈し、Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent 添加 10 分後に発光を測定しました。パネル B : 2 時間にわたり室温で発光を複数回測定しました。シグナル半減期はデータを単一指数曲線にフィッティングして決定しました。パネル C : HaloTag®-HiBiT タンパク質非存在下で各濃度の溶媒に Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent を添加して試薬バックグラウンドを測定しました。エラーバーは n=4 の標準偏差を示しています。



## アッセイバックグラウンドを上昇させる要因

Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent には、サンプルに含まれる HiBiT タグを直ちに飽和させるのに十分な濃度の LgBiT Protein が含まれています。HiBiT ペプチドは LgBiT 発光を  $10^8$  倍以上活性化することができますが、ある程度は他のペプチドやタンパク質配列が LgBiT に結合して活性化させる可能性もあります。一般的に、これは HiBiT よりはるかに低い親和性と活性倍率で発生しますが、LgBiT を活性化させるペプチドやタンパク質が高濃度で含まれているとアッセイバックグラウンドが上昇する可能性があります。このような活性化の可能性は、そのアッセイ条件により Nano-Glo® HiBiT Lytic Reagent よりも Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent で顕著になるかもしれません。

HiBiT タグ付きタンパク質を発現しない細胞は、培地だけの場合と比べるとアッセイバックグラウンドを上昇させます(図 11)。このバックグラウンドは通常、100 fM の HiBiT から得られるシグナル量を下回ります。培地に血清が存在することでもバックグラウンドレベルは上昇します(図 8、パネル C)。

サンプルに高濃度のペプチドを添加する場合(ペプチドライブラリーのスクリーニングなど)、HiBiT に似たペプチドが LiBiT Protein を活性化させることが確認されるかもしれません。このような LgBiT の活性化は、細胞や HiBiT の非存在下で Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent にペプチドを添加する二次アッセイを実施することで簡単に確認できます。小分子は LgBiT Protein を活性化させる可能性がありますが、初期のライブラリースクリーニング結果ではそのような化合物は非常にまれであることが示唆されています。

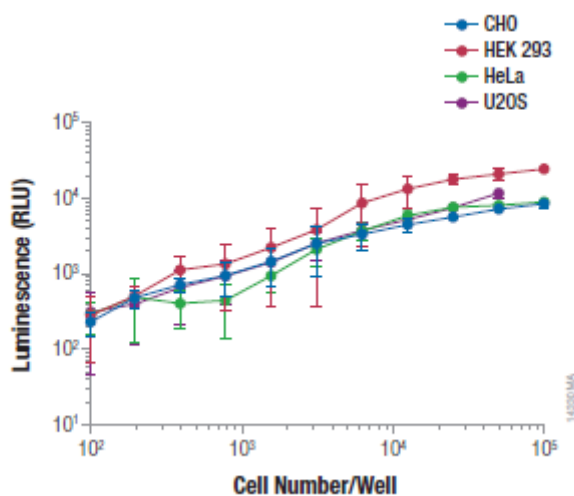


図 11. アッセイバックグラウンドに対する細胞数の影響。CHO 細胞、HEK 293 細胞、HeLa 細胞、または U2OS 細胞を解離させ、カウントし、DMEM 培地に段階希釈しました。96 ウェルプレートに滴定量の細胞を移した後、Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent を添加し、10 分後に発光を測定しました。バックグラウンドを差し引いた発光をプロットしました。エラーバーは  $n=4$  の標準偏差を示しています。

## 6.I. アッセイ感度の最大化

HiBiT タグ付きタンパク質が非常に低いレベルで存在する場合、最も正確な測定はシグナルを上昇させ、バックグラウンドを低下させることで達成できます。HiBiT シグナルがサンプルに含まれる HiBiT タグ付きタンパク質の量と確実に比例しているようにするため、アッセイバックグラウンドを差し引きます。このバックグラウンドは、ルミノメーターの機器バックグラウンド、furimazine 基質の自己発光、内因性 LgBiT 活性、およびサンプルに含まれるタンパク質、ペプチド、またはその他の化合物による LgBiT の非特異的活性化で構成されます。適切なバックグラウンドコントロールは、同じ培地で増殖した HiBiT タグ付きタンパク質を発現しない同数および同じ種類の細胞から成ります。これらのバックグラウンドコントロール細胞に試薬が添加された際に得られる発光を引くことで、ウェル内の HiBiT タグ付きタンパク質の量に比例した値が得られます。

フェノールレッドを含まない細胞培地を選択することで、さらに高いシグナルを達成できます (図 8、パネル A を参照)。培地に含まれる血清の量を低減または除去し、バックグラウンドの低い培地を選択することで、アッセイバックグラウンドを低下させます (図 8、パネル C を参照)。お使いのワークフローで可能な場合には、実験中または実験終了時に培地を除去し、フェノールレッドおよび血清が含まれない培地と交換することを検討します。また別の方法として、Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent は 2×reagent であるため、これを PBS で 1 : 1 に希釈して得られた 1×reagent を目的の時点において培地除去後にウェルに添加することができます (セクション 6.E のプロトコールを参照)。この方法は、接着細胞で HiBiT タグ付きタンパク質の細胞表面発現を測定する場合にのみ可能であり、分泌タンパク質や浮遊細胞には使用できません。

## 6.J. トラブルシューティング

本マニュアルで取り上げられていない質問については、弊社またはお近くの販売代理店にお問い合わせください。連絡先情報は [www.promega.jp](http://www.promega.jp) をご覧ください。

E-メール : [prometec@jp.promega.com](mailto:prometec@jp.promega.com)

症状	原因およびコメント
プレート全体でシグナル勾配がある、シグナルが急激に低下する	サンプルが事前に十分に混和されていない場合、シグナルが急速に低下することがあります。試薬添加後 30 秒間水平振とうしてサンプルを十分に混和させるか、プレートの測定にかかる時間を短縮する（測定時間の短縮など）か、この両方の方法を実施します。
急激なシグナル減衰が確認された	基質は HiBiT シグナルが高いと急激に枯渇します。トランスフェクションする DNA 量を減らす、トランスフェクションベクターで弱いプロモーターを使用する、またはウェルあたりの細胞数を減らすことにより、タンパク質発現レベルを低下させます。
小分子またはペプチドのライブラリーに偽ヒットの原因となる LgBiT 活性化因子が含まれている可能性がある	細胞または HiBiT の非存在下で化合物が LgBiT を活性化するかどうかを調べるための二次スクリーニングを実施します。推定される活性化因子のバッファー溶液を Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent に添加します。この実験では、活性化が HiBiT タグ付き POI と無関係であるかどうかを確認されます。
小分子またはペプチドのライブラリーに偽ヒットの原因となるルシフェラーゼ阻害物質が含まれている可能性がある	HiBiT Control Protein (カタログ番号 N3010) の 100 pM バッファー溶液を用いて細胞の非存在下で二次スクリーニングを実施します。タンパク質を Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent に加えて阻害が HiBiT タグ付き POI と無関係であるかどうかを判断します。ディスペンサーや試薬を HiBiT サンプルで汚染しないようにします。

## 6.J. トラブルシューティング（続き）

症状	原因およびコメント
<p>HiBiT が含まれないサンプルで高いバックグラウンドシグナルが確認される</p>	<p>HiBiT 検出感度は高いため、HiBiT タグ付きタンパク質を含むサンプルにより試薬や分注ラインが汚染されないようにします。例えば、HiBiT タグが含まれる細胞ライセートを自動注入システムで分注した場合、洗浄後であっても少量のタンパク質がディスペンサーの表面に吸着している可能性があります。このタンパク質はその後分注される Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent などの他の溶液の中に少量ずつ放出されるかもしれません。こうして、移行した HiBiT タグのためにアッセイのバックグラウンドが上昇する可能性があります。他の場所や材料が汚染されないようにするために、HiBiT Control Protein を取り扱う際には注意します。汚染とバックグラウンドシグナルの上昇を最小限に抑えるために、HiBiT Control Protein を含む溶液の分注では使い捨ての器具を使用することをおすすめします。</p> <p>バックグラウンド発光は細胞、血清、または特定の培地により上昇することがあります。試薬バックグラウンドを低下させる方法に関するアドバイスはセクション 6.H および 6.I をご覧ください。</p>
<p>シグナルが低すぎて正確に測定できない</p>	<p>血清濃度の低いフェノールレッド無添加の培地に切り替えてシグナル／バックグラウンド比を上昇させます。培地を除去して、PBS で 1 : 1 に希釈した 1×reagent に交換することを検討します。細胞を一過性トランスフェクションする場合、使用する発現コンストラクトの量を増やします。</p> <p>所定の融合パートナーまたはタグ配置の特性によっては、HiBiT タグへのアクセスしやすさが特に低下し、補完と発光が低下することがあります。HiBiT を他方のタンパク質末端に付加するか、タンパク質と HiBiT タグの間のリンカー長を変えてみてください。</p>
<p>処理に対する生物学的応答が低い</p>	<p>HiBiT タグ付き POI の発現が多すぎる可能性があります。キャリア DNA で発現コンストラクトを希釈する、弱いプロモーターに切り替える、または HiBiT タグ付きタンパク質を内在性レベルで発現するために CRISPR/Cas9 を使用することを検討します。</p>
<p>プレート間のばらつきが大きい</p>	<p>試薬添加後の経過時間を同じにしてプレートを測定します。各プレートで条件が同じになっていることを確認します（培地、細胞数、温度など）。一連のプレートをノーマライズするのに使用できる共通コントロールサンプルを各プレートに含めます。</p>

<p>どちらの末端もタグ付けに使用できない</p>	<p>HiBiT をアクセス可能な表面ループでタンパク質内部に付加します。シグナルおよび LgBiT との平衡化速度は、末端タグの場合に比べて低下する可能性があります。HiBiT の両端にリンカー（GSSGGSSG など）を付加することは、タンパク質のアクセスしやすさを高める役に立ちます。</p>
<p>細胞内にあるべき HiBiT タグ付きタンパク質からアッセイで強いシグナルが得られる</p>	<p>通常の細胞培養条件下では、ある程度の細胞溶解は一般的です。HiBiT タグ付きタンパク質は溶解した細胞から培地へと放出されたり、細胞片の中にある LgBiT に結合したりすることがあります。一過性トランスフェクションした細胞では、HiBiT タグ付きタンパク質を大量に過剰発現する亜集団は溶解する可能性が高く、基本条件下で細胞外に放出されるウェル内の総タンパク質量の割合が高くなる可能性があります。細胞を洗浄することはあまり効果的ではなく、それどころか HiBiT シグナルを含む細胞残余物や細胞片はウェルに結合したままであるため細胞外バックグラウンドを除去するには逆効果となるかもしれません。</p>
<p>輸送または分泌の実験で最初に得られるシグナルが高すぎる</p>	<p>細胞処理の開始時にすでに細胞外にある HiBiT タグ付きタンパク質から得られる基本シグナルは不要なバックグラウンドとなる可能性があります。細胞洗浄や培地交換ではこの問題を完全に解決することはできないかもしれません。誘導性発現系を使用することで処理前にタンパク質蓄積が低減されるため、特定の条件下でのタンパク質輸送の程度を測定するのに役立つ可能性があります。</p>

## 6.K. 参考文献

1. Dixon, A.S. et al. (2016) NanoLuc complementation reporter optimized for accurate measurement of protein interactions in cells. *ACS Chem. Biol.* 11, 400–8.
2. Zhao, Z. et al. (2006) Molecular characterization of loss-of-function mutations in PCSK9 and identification of a compound heterozygote. *Am. J. Hum. Genet.* 78, 514–23.
3. Hall, M.P. et al. (2012) Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. *ACS Chem. Biol.* 7, 1848–57.
4. Los, G.V. et al. (2008) HaloTag: A novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. *ACS Chem. Biol.* 3, 373–82.
5. Schwinn, M.K. et al. (2017) CRISPR-mediated tagging of endogenous proteins with a luminescent peptide. Manuscript submitted.
6. Seidah, N.G. et al. (2003) The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): Liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 928–33.
7. January, B. et al. (1998) Salmeterol-induced desensitization, internalization and phosphorylation of the human beta2-adrenoceptor. *Br. J. Pharmacol.* 123, 701–11.