

ウイルス研究ツール

Powered by Promega Technology



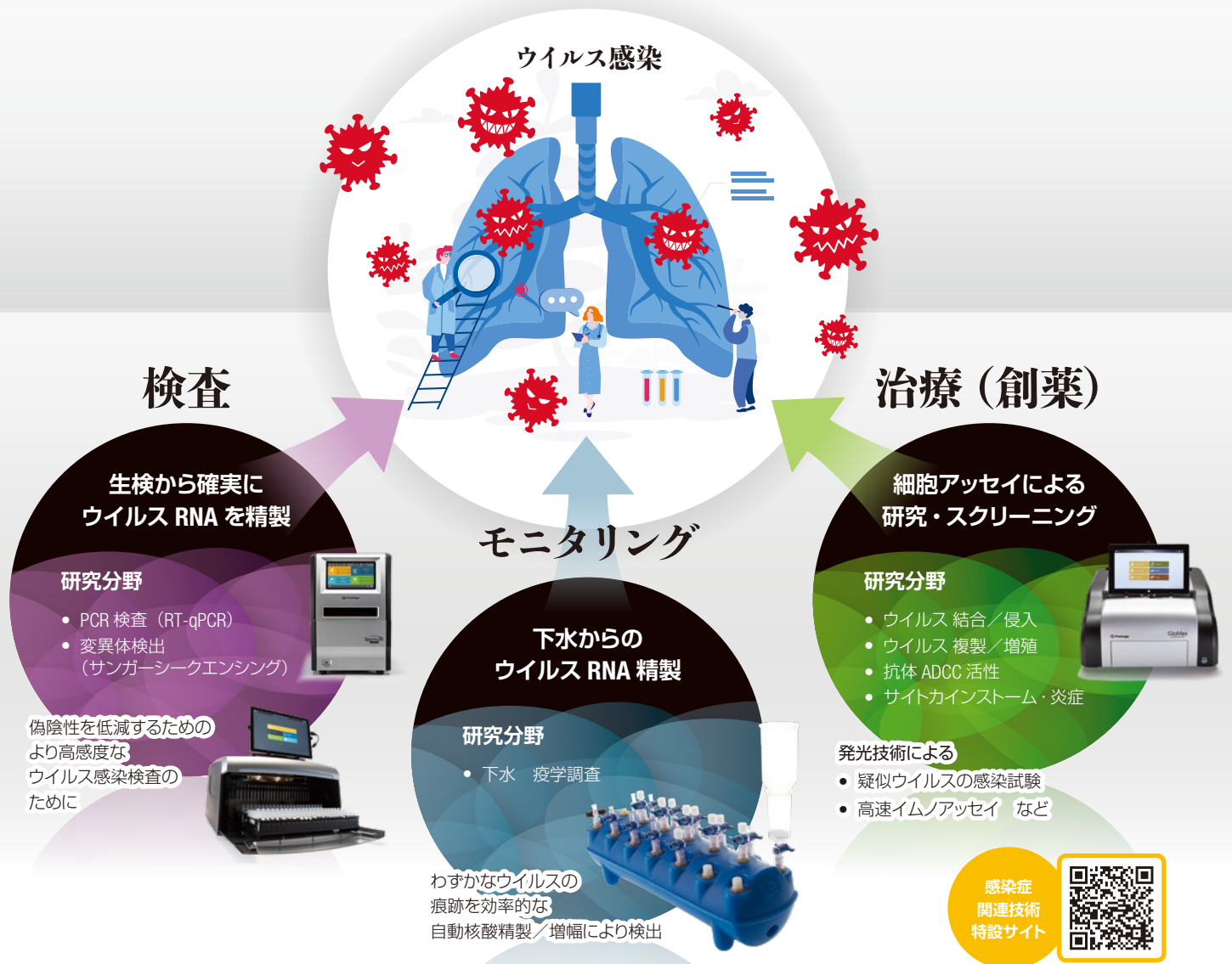
ワクチン・治療薬開発から
検査・モニタリングまで

最先端

COVID-19 に
打ち克つための
検出 & 分離
テクノロジー

プロメガ株式会社

ウイルス研究と関連するプロメガのコア技術



何を見ている？	実験レベル	サンプル	検出	テクノロジー	ページ
ACE2 ⇄ RBD 相互作用	タンパク質	中和抗体	発光 (結合 +、阻害 -)	Lumit™	3
ACE2 ⇄ RBD 相互作用	細胞 (遺伝子改変)	中和抗体	発光 (結合 +、阻害 -)	NanoBit™	3
PsVLP 粒子⇒ 宿主細胞 侵入	ウイルス：細胞 (遺伝子改変)	中和抗体	発光	SARS-CoV-2 HiBiT -PsVLP Assay	3
ウイルスによる細胞変性効果 (CPE)	細胞	中和抗体	発光	Glo アッセイ	4
3CLpro および PLpro の配列特異的な プロテアーゼ活性	タンパク質	阻害剤 (低分子他)	発光	Virul Protease Assay (ルシフェリンブローブ)	4
配列特異的な プロテアーゼ活性 を検出するプロテアーゼセンサー	細胞 (遺伝子改変)	阻害剤 (低分子他)	発光	GloSensor™	4
レポーター活性 (SARS- ADCC)	細胞 (遺伝子改変)	中和抗体	発光	レポーター バイオアッセイ	5
キリングアッセイ評価 (SARS-PBMC- ADCC)	細胞 (遺伝子改変)	中和抗体	発光	SARS-CoV-2 PBMC ADCC Assay (HiBiT 発現細胞)	5
カスパーゼ -1 活性化	細胞	阻害剤 (低分子他)	発光	ルシフェリンブローブ	5
IL-1β、IL-6	細胞	阻害剤 (低分子他)	発光	Lumit™	5
ウイルスゲノム 変異体の検出	核酸	核酸 (臨床検体)	サンガーシークエンシング	Spectrum Compact + ProDye™	6-7
患者の ウイルスゲノム の検出	核酸	核酸 (臨床検体)	RT-qPCR	Maxwell® + GoTaq® RT-qPCR	6-7
下水中の ウイルスゲノム の検出	核酸	核酸 (下水)	RT-qPCR	Maxwell® + GoTaq® RT-qPCR for Wastewater	8



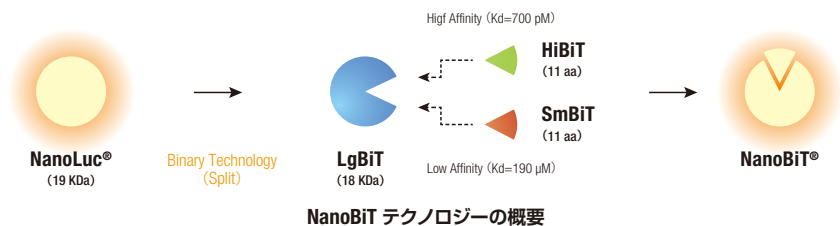
ウイルス 結合／侵入

スプリット発光酵素 NanoBiT® によるタンパク質結合性の検出



ウイルスおよび宿主細胞のタンパク質の相互作用には、コロナウイルスのスパイクタンパク質と宿主細胞表面の ACE2 タンパク質との代表的な相互作用をはじめとする、ウイルスの侵入時に細胞内で起こる様々な相互作用が含まれます。これらのウイルスタンパク質や、宿主細胞のタンパク質の相互作用を阻害する薬剤の開発は、治療介入のための重要なターゲットとなります。また、ワクチンの有効性は、ウイルスの細胞内侵入（相互作用）を防ぐ血清の能力を調べることで判断することができます。

新しい高輝度発光酵素 NanoLuc® を分割した NanoBiT® テクノロジーでは 11 アミノ酸（小サブユニット）と 18 kDa（大サブユニット）の相補性により発光活性が再成されることを利用して、タンパク質間の相互作用や標的タンパク質の存在量を高感度に測定することができます。高感度検出可能でしかも小さなペプチドタグを利用することでこれまで困難であったウイルスアプリケーションにも利用することができるようになりました。これによりタグまたは抗体ベースのタンパク質：タンパク質の相互作用、ウイルスの細胞内侵入の検出ならびに阻害剤、中和抗体の力価測定などに応用することができます。



発光 イムノアッセイ

in vitro タンパク質間相互作用検出



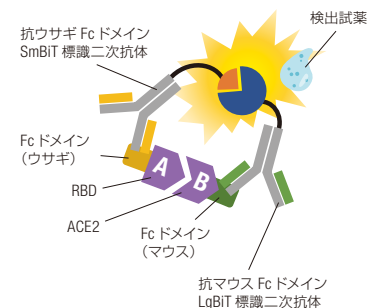
抗体のコーティング、洗浄が不要な発光イムノアッセイ

抗 Fc ドメイン SmBiT および LgBiT 標識 2 次抗体を利用して RBD（ウサギ Fc ドメイン タグを融合）と ACE2（マウス Fc ドメインタグを融合）の相互作用を検出します。RBD と ACE2 が相互作用するとそれぞれの Fc ドメイン上エピトープに対応する Lumit™ 2 次抗体（抗ウサギ抗体と抗マウス抗体）が結合することで SmBiT と LgBiT が近接して活性型のルシフェラーゼ酵素を形成して相互作用に比例した光を生じます。RBD と ACE2 の相互作用が解離すると発光が低下するため、抗体や化合物など相互作用阻害分子の効果をアッセイすることができます。

変異型 Spike RBD を用いた相互作用については別途お問合せください。

※イギリス型（N501Y）、南アフリカ型（K417N, E484K, N501Y）、ブラジル型（K417T, E484K, N501Y）

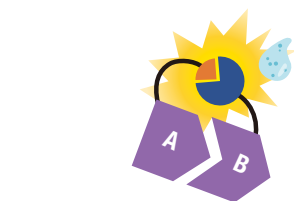
参考文献：Alves, J. et al.; A bioluminescent and homogeneous SARS-CoV-2 spike RBD and hACE2 interaction assay for antiviral screening and monitoring patient neutralizing antibody levels. *Sci Rep.* 2021 Sep 16;11(1)



発光細胞ベース PPI

細胞内タンパク質間相互作用検出

細胞内で ACE2 : LgBiT、BRD : SmBiT を発現させ、ライセートまたは上清を用いて 2 つの融合体が相互作用すると発光シグナルを生じます。阻害剤や抗体のスクリーニングや効果測定などに使用することができます。

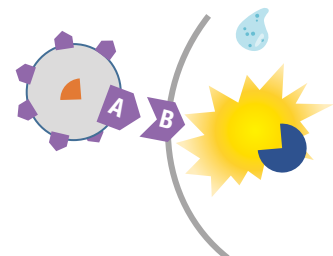


細胞ベース RBD : ACE2 相互作用アッセイの概要

発光細胞ベース ウイルス侵入

細胞感染検出法

SARS-CoV-2 HiBiT-PsVLP アッセイを用いれば、宿主細胞へのウイルスの侵入を阻止する低分子阻害剤や中和抗体の活性を測定することができます。このアッセイでは、革新的な HiBiT バイオルミネセンス技術を用いて、表面にスパイクタンパク質を含み、HiBiT がパッケージングされているシュードタイプのウイルス様粒子（PsVLP）が LgBiT を発現する細胞への実際の侵入を発光検出します。この PsVLP は、ウイルスの遺伝物質を含まないため、非感染性（BSL2）です。



SARS-CoV-2 HiBiT-PsVLP アッセイの概要



ウイルス複製／増殖

ホタルルシフェラーゼ反応によるウイルス増殖マーカーの検出

ホタルルシフェラーゼによる発光反応はレポーター酵素としての測定だけにとどまらず、ATP あるいは修飾ルシフェリンをルシフェリンに変換する様々な生体分子の測定に利用されてきました（細胞生存マーカー ATP、ルシフェリンプロープとルシフェラーゼセンサー）。ウイルス由来のプロテアーゼ活性を修飾ルシフェリン基質あるいは改変ルシフェラーゼセンサーにより発光シグナルをアウトプットとしたアッセイが構築できます。またウイルス細胞変性効果（CPE）についてもウイルス負荷を生細胞由来の ATP の減少としてとらえることができます。

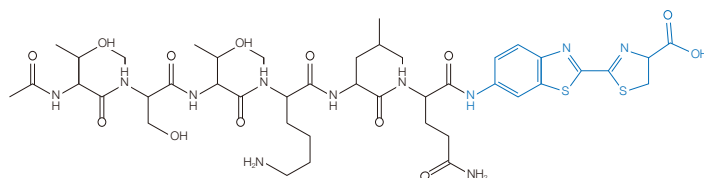
発光プロープ

修飾ルシフェリン基質による プロテアーゼ活性測定

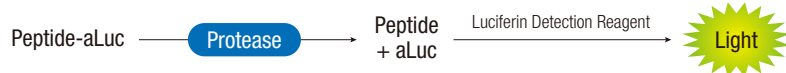


ホタルルシフェリンを修飾したルシフェリンプロープはカスパーゼなどのプロテアーゼをはじめ、様々な活性を測定するための反応基質として利用されています。

SARS-CoV-2 3CLpro and PLpro Luminescent Assay は、ペプチドアミノルシフェリン（ペプチド-aLuc）基質を使用し、マルチウェルプレートフォーマットで、プロテアーゼ阻害剤のスクリーニングと特性評価に使用できる発光アッセイです。プロテアーゼにより修飾基質のペプチド部分が切断されてアミノルシフェリンとなり、安定化されたルシフェラーゼ（UltraGlo™ Luciferase）と反応してプロテアーゼ活性に比例したグロータイプの光を生じます。



3CLPro Ac-TSTKLQ-aLuc 発光基質

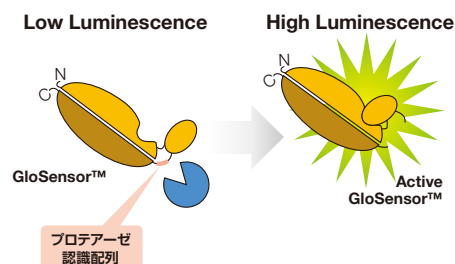


発光タンパク質 センサー

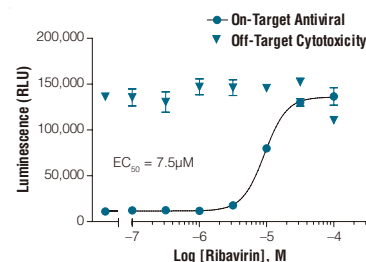
改変ルシフェラーゼ酵素によるプロテアーゼ活性 リアルタイム測定（ルシフェラーゼセンサー）



GloSensor™ Protease Assay Technology では、特定のプロテアーゼ切断部位を内部に含むルシフェラーゼセンサーを用いて *in vitro* および *in vivo* でのプロテアーゼ活性をモニタリングに使用することができます。このルシフェラーゼセンサーが特定のプロテアーゼにより切断されると構造上の制約が解除され、発光活性が大幅に増加します。カスパーゼ 3/7 やグランザイム B 用の切断部位を導入すれば、*in vitro* 由来または *ex vivo* の細胞傷害性 T リンパ球（CTL）によって媒介される標的細胞のアポトーシスを検出したり、ウイルス特異的なプロテアーゼ切断部位を導入すれば抗ウイルス薬のスクリーニングなどに利用することができます。



ホタルルシフェラーゼ酵素を改変した
プロテアーゼセンサー



抗ウイルス剤の効力を迅速かつ簡便に測定

試験化合物はオフターゲットの細胞毒性を伴わずにウイルスの CPE を減少させた。100 TCID₅₀ の H1N1 を添加した MDCK 細胞（オンターゲットの抗ウイルス）または MDCK 細胞のみ（オフターゲットの細胞毒性）。

ATP 測定

ウイルス誘発性細胞変性効果（CPE）測定



Viral ToxGlo™ Assay は、溶解性ウイルス粒子に起因する宿主細胞におけるウイルス細胞変性効果（CPE）を定量化できる簡便な方法です。このアッセイは、宿主細胞の生存性の代替測定値として細胞内 ATP を測定します。ウイルス感染により CPE が起きると ATP の枯渇が測定されウイルス負荷に比例します。検出された ATP 量は培養中の生きた宿主細胞の数に直接比例し、ウイルス細胞変性効果を定量化するシンプルな方法として利用することができます。



免疫反応の活性化と抑制

ADCC 活性測定および炎症関連マーカーの発光測定

ウイルス感染に対する宿主の免疫反応は、基礎研究から薬剤・ワクチン開発までの重要なテーマです。プロメガは自然免疫と適応免疫を調べるための多彩なアッセイツールボックスを提供しています。抗体医薬による免疫細胞の活性化とリクルートは、新しい治療コンセプトです。独自の ADCC アッセイをはじめとするプロメガの生物発光レポーターアッセイの膨大なポートフォリオは、生物製剤の開発を様々なレベルでサポートしています。これには、作用機序（MOA）分析や、混合細胞集団における標的細胞のみの細胞死を選択的に定量化するための HiBiT 標的細胞の幅広い選択が含まれます。インフラマソームの活性化は、カスパーゼ -1 活性、サイトカイン（IL-1 β など）の放出などを測定することで検出することができます。

ADCC 活性測定



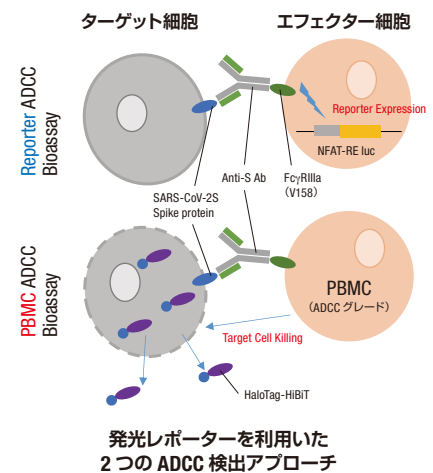
レポーター細胞

レポーターを利用した 2つの ADCC 発光バイオアッセイ

Reporter ADCC Bioassay では Fc エフェクター細胞として Fc γ Rs および NFAT- 誘導性ルシフェラーゼを安定に発現する Jurkat 細胞を使用し、ADCC 活性をルシフェラーゼ発光として検出します。ターゲット細胞として S- スパイクタンパク質を発現する細胞を使用します。

PBMC ADCC Bioassay は HiBiT 融合タンパク質、および S- スパイクタンパク質を発現するターゲット細胞に対応する PBMC ADCC バイオアッセイキットです。ADCC グレードのヒト PBMC も添付されています。ターゲット細胞が障害されると細胞内で発現する HiBiT タンパク質が漏出するため、発光検出試薬を添加するだけで ADCC による細胞障害性を簡便、高感度に測定することができます。

どちらも細胞が供給されるので、ご自身で細胞を準備する必要はなく、簡単に実施することができます。



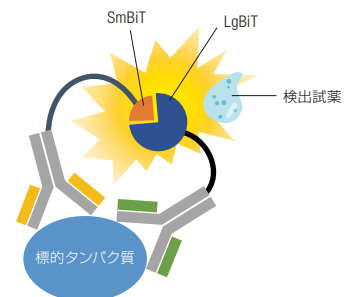
サイトカインストーム・炎症



イムノアッセイ

洗浄不要のホモジニアス発光イムノアッセイ

Lumit™ イムノアッセイは洗浄の不要なホモジニアスアッセイです。プロトコルは、サンプルへ標識抗体および検出試薬（発光基質を含む）を随時添加し、発光シグナルを測定するだけのシンプルな手順です。全工程が 70 分以内に完了します。IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α に対する Lumit™ イムノアッセイがご利用いただけます。詳細については弊社までお問合せください。



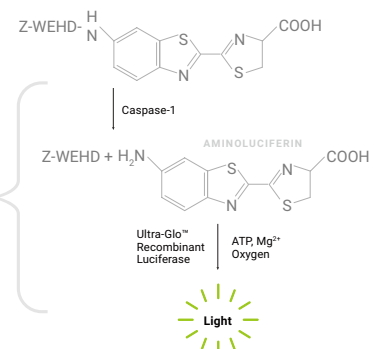
Lumit™ イムノアッセイの概要

発光プローブ

カスパーゼ -1 活性の発光測定



Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay はインフラマソームの必須構成要素カスパーゼ -1 の活性を選択的に測定するシンプルでホモジニアスな発光法です。カスパーゼ -1 活性化の結果、サイトカイン IL-1 β および IL-18 のプロセッシングと放出が起こり、免疫原性の細胞死であるパイロトーシスとなります。Caspase-Glo 1 assay は細胞内や培地中のカスパーゼ -1 活性を直接測定できる感度を有しています。



カスパーゼ 1 活性測定用修飾ルシフェリン基質



臨床検体からのウイルス核酸精製

検体数に応じたマニュアル～自動精製

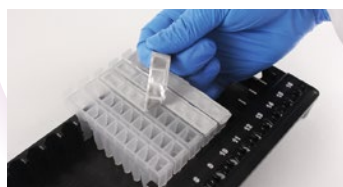


核酸情報からのウイルス検出（感染検査）における最も重要なポイントは、微量な標的核酸を効率よく回収し、阻害物質を除去することです。ダイレクト PCR 技術で直接検体を PCR に用いる方法もありますが、より擬陰性を低減し、検出感度を上げるために、精製ステップを加えることは非常に重要です。

プロメガは 20 年以上にわたり核酸精製技術を発展させ、より回収率、精製度の高いマニュアルキットおよび自動精製システムを開発してきました。これまでの基礎研究分野での信頼と実績により、コロナ禍において日本全国の病院・検査所で採用いただきました。

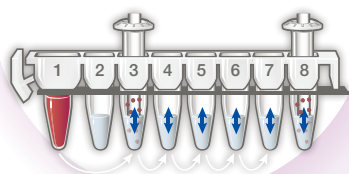
ベストな試薬を簡単に

長年培った試薬開発技術を注ぎ込んだ最高の試薬！
しかも準備はシールをはがすだけ！



トラブル知らず

磁性体ビーズを用いたシンプル精製法で
核酸をガッチリ捕捉、しっかり洗浄



しかも早っ！

このスピード感、
ぜひ動画でご体験ください！



Maxwell® RSC Instrument
1 ～ 16 検体処理 (カタログ番号 AS4500)



核酸自動精製装置

Maxwell® RSC 48 Instrument
1 ～ 48 検体処理 (カタログ番号 AS8500)

ウイルス RNA 精製アプリケーション（試薬キット）

自動精製

Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit
(カタログ番号 AS1330)

- ・咽頭ぬぐい液簡易マニュアル
- ・喀痰簡易マニュアル
- ・唾液簡易マニュアル

マニュアル精製

ReliaPrep™ Viral TNA Miniprep System, Custom
(カタログ番号 AX4820)

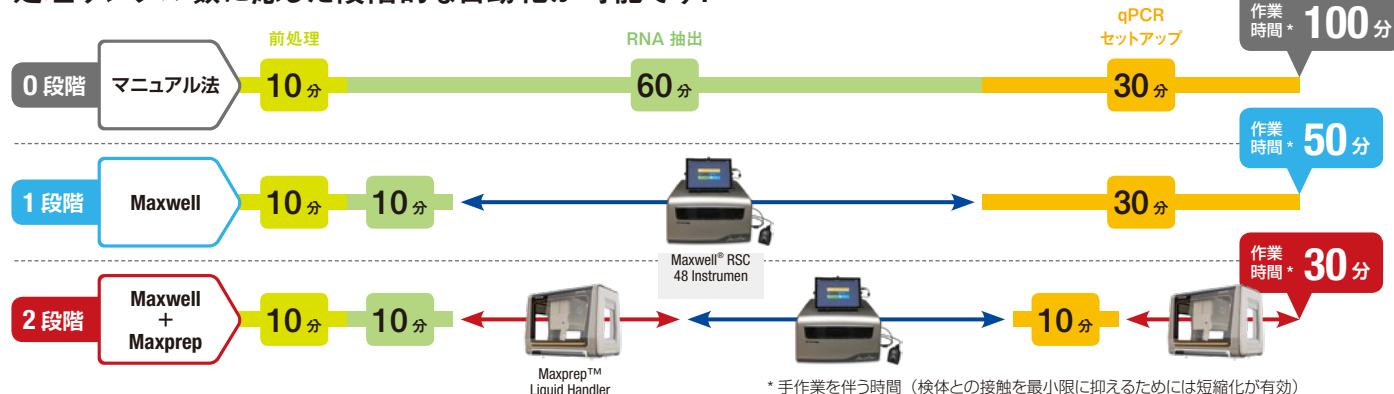
- ・鼻咽頭ぬぐい液簡易マニュアル
- ・喀痰簡易マニュアル

Maxwell® システムは
様々なサンプルからの
核酸精製にも対応します。



Maxwell®
アプリケーションリスト

処理サンプル数に応じた段階的な自動化が可能です！





変異体検出

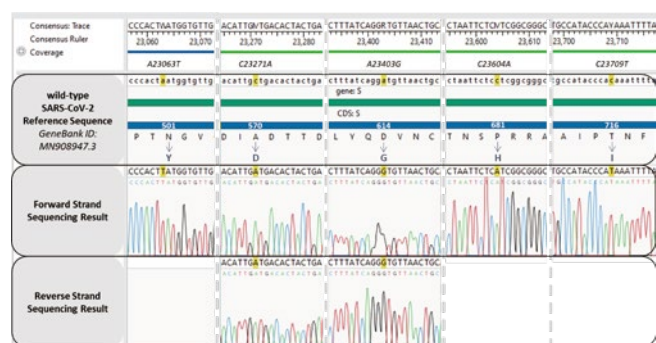
サンガーシーケンシングによる配列解析

新製品 Spectrum Compact CE および ProDye™ 登場!

NEW



プロメガの新製品 Spectrum Compact CE システムは研究室に備えたい柔軟性の高いパーソナルなキャピラリーシーケンサー（4本キャピラリー）で、正確で、迅速（Fast 30分/600bp）なシーケンシング機能に加え、新しいProDye™ シーケンシング試薬を併用することでコストを抑えた配列決定を行うことができます。ちょっとした配列確認や急な用途にも素早く対応でき、COVID-19 変異体検出アプリケーション資料もウェブよりダウンロードできます。装置・試薬ともに他社製品でも使用できるユニバーサル設計です。柔軟性と確実性は診断法の開発などにも最適です。もちろんフラグメント解析にも使用できます。



Spectrum Compact により SARS-CoV-2 変異体の検出

スワブより自動精製装置 Maxwell® で精製した核酸溶液に合成 SARS-CoV-2 RNA をスパイクしたサンプルを用いて Spectrum Compact シーケンシングシステムにより配列を決定した。その結果、SARS-CoV-2 のゲノムには、スパイクタンパク質の特徴的なアミノ酸置換に対応する点変異が観察された。

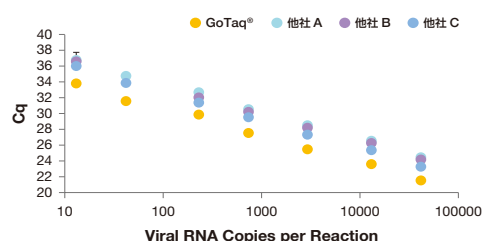
- 確実に迅速な配列決定：Fast 30分/600bp、Standard 60分/750bp（最大リード長～900bp）
- 消耗品は個別カートリッジで試薬の無駄を排除
- さらに新しいシーケンシング試薬でコストを低減
- 使いやすいタッチパネルでPC内蔵
- 便利なローカルネットワークアクセス
- 無償の ProView™ Sequencing Software も提供
- 核酸精製に強いプロメガはサンプル調製もサポート可能



ProDye™ Terminator Sequencing System

ウイルス感染検査

RT-qPCR による検査



ウイルス RNA 検出パフォーマンスの他社製品との比較

コロナ検査にも使用された RT-qPCR キット：RT-qPCR 製品を含む PCR 試薬は、目的のウイルス配列を検出・増幅するために使用され、ウイルス学の研究に広く利用されています。プロメガの GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System は、米国疾病対策予防センター（CDC）の 2019-Novel Coronavirus Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel の推奨マスターミックスオプションであり、日本においては国立感染症研究所で確立された遺伝子検査方法との一定の一致率が確認された遺伝子検査方法です。

ダイレクト PCR 用試薬：XpressAmp™ Direct Amplification Reagents は、事前に RNA や DNA を抽出することなくダイレクト PCR を可能にします。これらの試薬は、RT-qPCR アッセイで分析するためのウイルスサンプルの調製に使用されます。

感染モニタリングや疫学研究のために、前処理された廃水中の SARS-CoV-2 ウイルス RNA を検出するように設計された **SARS-CoV-2 RT-qPCR Kit for Wastewater** も新たに開発されました。（最終ページ参照）。

※検査キットなどに使用する増幅酵素、逆転写酵素、RNA 分解酵素阻害剤など原料供給も承ります。



Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold

下水疫学調査

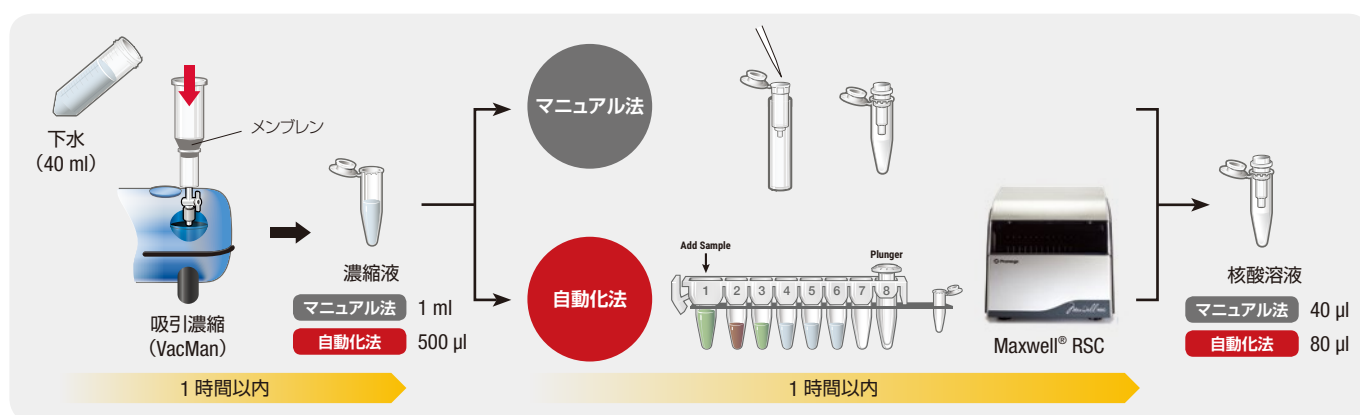
ダイレクトキャプチャー法による効率的なウイルス検出



新型コロナウイルス感染症の拡大を事前に防止するためのモニタリング法を構築することは喫緊の課題です。下水に含まれる標的ウイルス配列を定点観測することで、ウイルス感染を事前に予測することができます。

プロメガ独自の吸引法によるダイレクトキャプチャー法ならば、ウイルス粒子を濃縮するために面倒な超遠心分離を必要とする PEG/NaCl 沈殿法よりもはるかに素早くウイルス TNA (total nucleic acids) を濃縮および捕捉し、安定した収率を実現します。

サンプルから精製 TNA の取得までのプロセス全体は 2 時間以内に完了し、スケールの変更も自在で、様々なニーズに適應します。このプロセスではほとんどの PCR 阻害剤も除去されるため、得られた TNA は、下水用 SARS-CoV-2 RT-qPCR Kit for Wastewater を使用した SARS-CoV-2 の RNA 増幅ですぐに使用することができます。

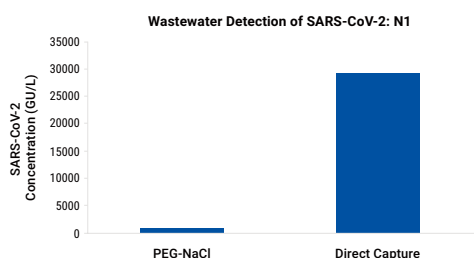


プロメガのダイレクトキャプチャー法によるウイルス核酸の迅速な濃縮・精製

吸引マニホルド Vac-Man®, 自動精製装置 Maxwell® RSC および試薬キット Wizard® Enviro Total Nucleic Acid Kit (マニュアル法) または Maxwell® RSC Enviro Total Nucleic Acid Kit (自動化法) を利用した精製フロー。

SARS-CoV-2 RT-qPCR Kit for Wastewater には以下の特長があります。

- SARS-CoV-2、PMMoV (プロセスコントロール)、内部増幅コントロール (偽陰性検出用内部標準) をマルチプレックス PCR で同時測定
- CDC 推奨の SARS-CoV-2 プライマー/プローブセット: N1 のみ、N2 のみ、E のみ、または 3-in-1 (N1、N2、E を含む) RT-qPCR キットから選択可能
- SARS-CoV-2 変異株用プライマー/プローブパネルを用いてアルファ、ベータ、ガンマ、デルタ株のモニタリングも可能
- PMMoV、MS2、HF183/crAssphage に特化したキットもご用意しています (詳細はお問い合わせください)。



PEG/NaCl よりも高い収率が得られる直接捕捉法

予備データは、直接捕捉法が PEG/NaCl 法と比較して 30 倍高い SARS-CoV-2 RNA 収量をもたらしたことを示した。下水サンプルは、米国の主要都市から収集された。

日本オリジナルサイト: www.promega.co.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2021年12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