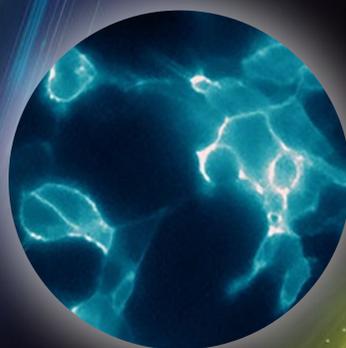
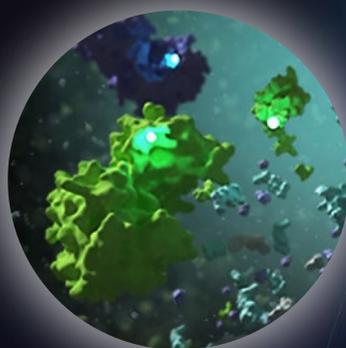
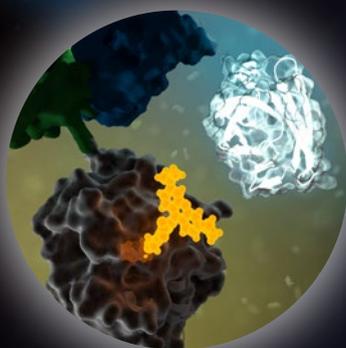


# 発光レポーターガイド

最新のレポーターテクノロジーとアプリケーション

最新鋭 NanoLuc® ルシフェラーゼが広げるレポーターの可能性！



## 第1章 レポーターアッセイとテクノロジー

- これまでとこれからのレポーター ..... 2
- 最新鋭レポーター – NanoLuc® ルシフェラーゼ ..... 4
- デュアルレポーター & マルチアッセイ ..... 6
- リアルタイムアッセイ ..... 8

## 第2章 レポーターアッセイでできること

- シグナルパスウェイ解析 ..... 10
- タンパク質間相互作用 (PPI 解析) ..... 12
- プロモーター解析 ..... 14
- 核内受容体解析 ..... 14
- タンパク質安定性解析 ..... 15
- RNA 干渉解析 ..... 16
- *in vivo* イメージング & ウイルスのマーキング ..... 17

## 第3章 レポーターアッセイ試薬 & レポーターベクター

- レポーター実験の流れ ..... 18
- アッセイ / 検出試薬 ..... 20
- レポーターベクター・クローン・細胞 ..... 26
- 関連製品 (トランスフェクション・マルチアッセイ・ルミノメーター) ..... 30

近年、遺伝子やタンパク質発現解析技術・検出装置の急速な発展により、さまざまな状況下で目的分子の挙動を捉えることができるようになってきました。さらに、生きた細胞を用いて生理現象を“ありのまま”観察したいというニーズも高まっており、これに応える技術や手法の開発も活発化しています。

一方で、個々の遺伝子の産物である mRNA、タンパク質はそれぞれ非常にユニークな性質を持つため、汎用的な解析手法が使えないことが多く、解決すべき問題点となっています。たとえばタンパク質発現量を定量する場合、ウェスタンブロットティングや ELISA の検出感度は各タンパク質に対する抗体の性能に大きく依存するため、異なるタンパク質の発現量を比較するのは難しい場合があります。

**Sensitivity**  
**X1** レポーター黎明期

**Sensitivity**  
**X100** レポーター成長期

**Sensitivity**  
**X10,000** レポーター

1985

**Cat / β-Gal**

**発光酵素ルシフェラーゼ**

ホタルルシフェラーゼは高感度、低バックグラウンドで高いS/N比が得られるとともにその簡便性からレポーターアッセイの代名詞に。

1995

**FLuc**

**デュアルアッセイ**

同一サンプルより基質特異性の異なるホタルとウミシイタケルシフェラーゼが測定可能となり、内部補正がレポーター実験の信頼性を向上。

2000

**RLuc**

2010

**NanoLuc®**

**Assay (定量)**

シングルアッセイ

デュアルアッセイ (6, 21 ページ)

リアルタイムモニタリング

**レポーターアッセイ**

目的遺伝子の発現調節を調べるために測定が容易なレポーター酵素に変換した測定手法。当初は比色法の β-Gal、RLuc の CAT が汎用される。

**Glo テクノロジー (24 ページ)**

瞬間的な発光 (フラッシュタイプ) から試薬の改良により長時間発光 (グロータイプ) へと進化し、格段に使いやすくハイスループット化を加速。

**pGL4**

プラスミドベクターに本来存在するコンセンサス配列 (転写因子の結合サイト) でプロモーターによる発現制御へ変則的な影響をあたえる) を極力削ぎ取り、目的のシグナルを明瞭化。

**蛍光タンパク質**

オワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質がイメージングへ応用され、タンパク質のイメージングが容易に。

**HaloTag® (25, 28 ページ)**

30 kDa のリガンド結合性タンパク質タグ。標識リガンドの付替えが可能。BRET アクセプターとして最適な蛍光特性をしめす Ligand も新たに開発。

**GFP**

**HaloTag®**

**Imaging (定性)**

イメージング

蛍光タグ (HaloTag®)

また mRNA を RT-PCR や DNA アレイで検出する場合にも、塩基配列の違いにより各遺伝子の定量性に差や偏りが出ることもあり、誤差の補正は容易ではありません。決定的なデメリットとしてどちらも生きた細胞をそのまま使うことはできず、ライセートの調製や核酸の精製などの前処理があり手技や経験によって結果に影響を及ぼす可能性もあります。レポーターアッセイは遺伝子発現実験には欠かせない手法として確立し、生きた細胞内の情報をより正確にレポーターングする技術へと進化をつづけています。

レポーターアッセイとは原理的に、ある生体内の分子の作用・挙動を観察可能なパラメーター（レポーター活性）に変換する手法です。同じレポーター遺伝子を使用することで、異なる遺伝子の発現量を同じ方法で、しかも非常に高感度に比較できます。さらに生細胞でのアッセイもできるため、同一サンプルでの継続的な変化を調べることが可能になります。また単にレポータータンパク質の発現量を調べるだけでなく、レポーターの改変・融合により様々なバイオセンサーも開発されています。例えば生細胞内 cAMP 量や ATP 量の変化を検出するセンサーやプロテアーゼ活性のセンサー、さらに低酸素や細胞周期など特定の状態にある細胞を検出するセンサーも開発されています。さらに新しく開発された NanoLuc® の強力な発光レベルは内在プロモーターによる遺伝子発現の検出やトランスフェクション効率の低い初代培養細胞でのレポーターアッセイ、さらには細胞内における分子光源（例：BRET）としての可能性も有しています。

このガイドでは、最新の知見とともにレポーターアッセイについてご紹介します。

レポーター拡大期

2015 ~

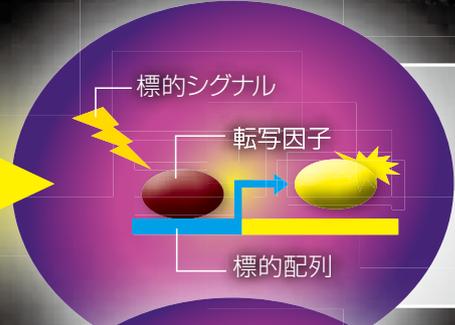
NanoLuc® 誕生 (4 ページ)

発光強度の飛躍的な増加と小さな分子重により、新しいアプリケーションの広がりとともに生体レベルを反映した実験が可能に。

レポーター酵素  
(転写・発現調節)

レポーター酵素変異体  
(発光センサー)

レポーター酵素融合体  
(発光タグ)

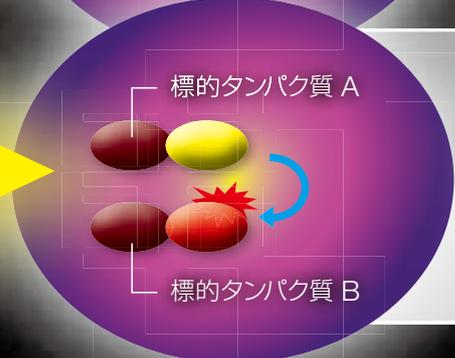


- **プロモーター解析** (14 ページ)
- **シグナル伝達解析** (10 ページ)

**NanoDual**  
(21 ページ)



- **cAMP モニタリング** (9, 29 ページ)
- **プロテアーゼ活性の定量・モニタリング** (29 ページ)



- **タンパク質相互作用** (12 ページ)
- **タンパク質イメージング** (17 ページ)
- **タンパク質安定性試験** (15 ページ)
- **RNA 干渉解析** (16 ページ)

**NanoBRET**  
(25 ページ)

もっと明るく レポーターの進化 ①

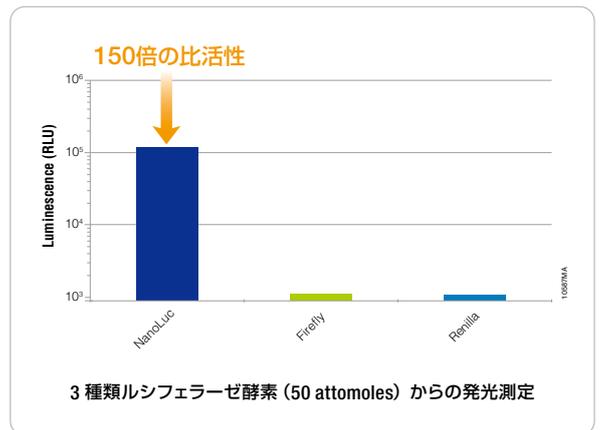
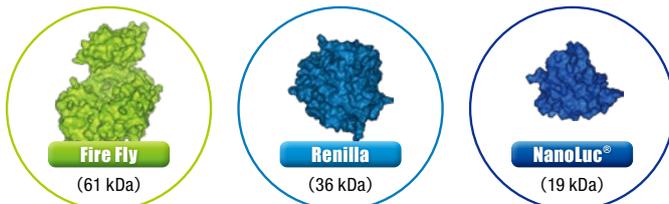
## 最新鋭レポーター – NanoLuc® ルシフェラーゼ –

### NanoLuc® の特性

これまで発光酵素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生命科学に有効なツールとして高感度であると同時に分子量も小さい NanoLuc® を開発しました。

NanoLuc® (Nluc) は深海エビ(トゲオキヒオドシエビ [*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 150 倍明るく、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。発光反応は ATP 非依存性で、最大の感度を得るためにバックグラウンド発光が抑えられるようにデザインされています。

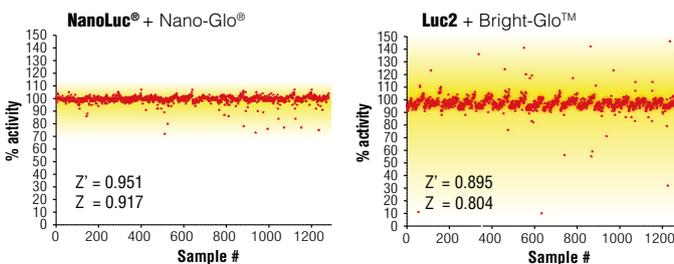
分子量が小さく、強い発光を示す特性の利点は、応用可能なアプリケーションが広がると同時に少ない分子数 (実際の生体内発現レベルと同等) で十分な発光シグナルが得られるため、より生体システムに近い細胞内環境で実験を行えることです。



### NanoLuc® ルシフェラーゼの特性

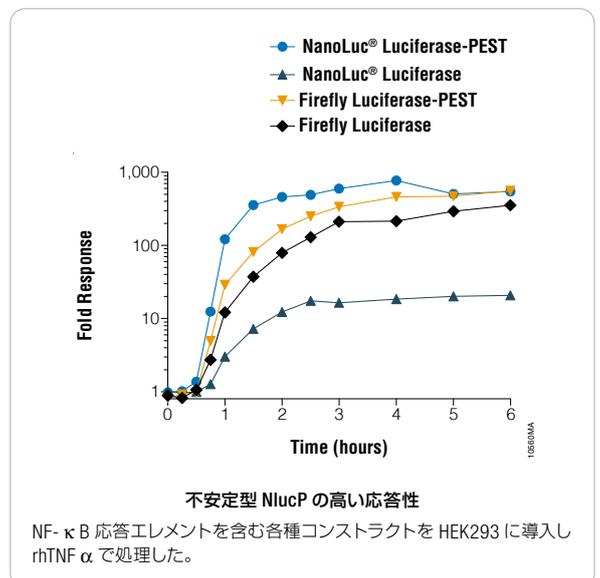
- 非常に小さい、単量体酵素 (171 アミノ酸 ; 513 bp)
- ATP 非依存性
- 高い熱安定性 ( $T_m = 60^\circ\text{C}$ )
- 広範な pH 幅で活性を保持 (pH 6–8)
- 翻訳後修飾、ジスルフィド結合がない
- 細胞内で均一に分布
- 蛍光スペクトルが生物発光共鳴エネルギー転移 (BRET ;  $\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ nm}$ ) に最適

### 安定 : 活性阻害を受けにくく HTS にマッチ!



### NanoLuc® およびホタルルシフェラーゼの化合物による阻害

各精製ルシフェラーゼ酵素を LOPAC ライブラリー (1,280 種類の化合物) とインベキューションし、Nano-Glo® および Bright-Glo™ で発光を測定した。

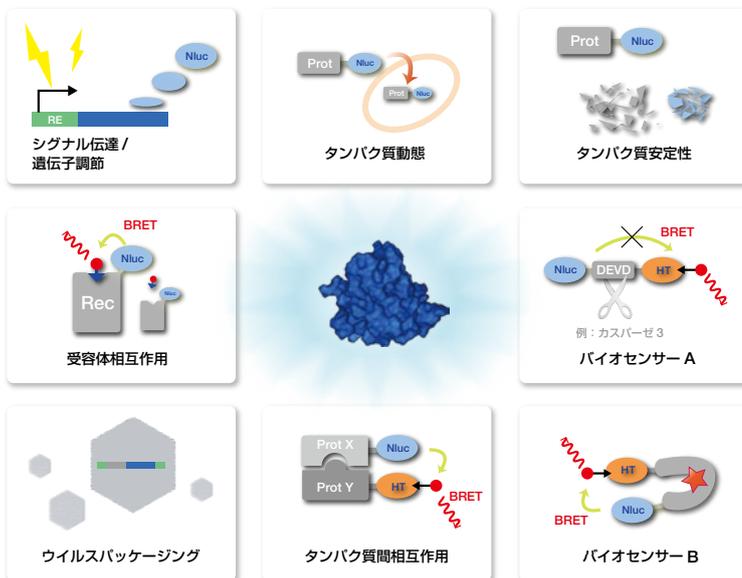


## NanoLuc® ルシフェラーゼ

### 新しいアプリケーションへの応用

発光強度が高く、分子量の小さな NanoLuc® ルシフェラーゼはこれまでのレポーターアプリケーションに、これまでに無い感度を与えます。これまでは困難であった低発現レベル（例：細胞の内在プロモーター、トランスフェクション効率の低い初代培養細胞）でも確実にシグナルを捉えることができます。また、分子量の小ささは従来のホタルルシフェラーゼの分子量の大きさが問題となる場合に有効です。例えば、ウイルスへのパッケージングや標的タンパク質と融合させイメージングやセンサーの作成を行う場合は分子量が小さいことが大きなメリットとなります。NanoLuc® は従来のレポーターアッセイのパフォーマンスを高めるだけでなく、その他の発光アプリケーション（タンパク質安定性の変動追跡、BRET によるタンパク質相互作用検出、*in vivo* イメージング）などを高感度に行うことができます。

ホタルルシフェラーゼと組み合わせた最新デュアル - ルシフェラーゼアッセイシステムが発売されました（21 ページ参照）。

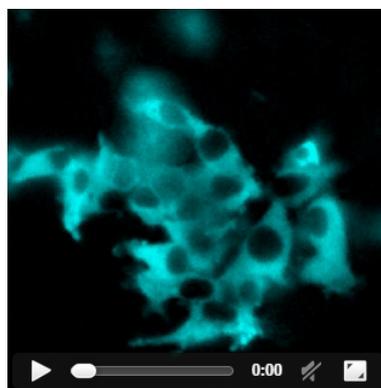


### 内在レベルで観察できるから“ゲノム編集技術”との親和性も抜群です。

NanoLuc® はホタルやウミシイタケルシフェラーゼよりも約 100 倍明るい約 100 倍の感度を備えます。これはホタルやウミシイタケルシフェラーゼと同等のシグナルを得るのに NanoLuc® ならば 1/100 の分子数で賄えることを意味します。低レベル発現での検出が可能となり、生理的レベルに近い分子濃度でイベントが検出できる可能性を示唆しています。内在レベルで発現する NanoLuc® ルシフェラーゼ融合体でもハイスループットスクリーニングに十分な発光が得られます。また、ゲノム編集技術を用いて、特定疾患パスイの研究標的となるタンパク質との NanoLuc® 融合体の作製も行われ、内在レベルの発現変化を感度良く測定することにも成功しています。さらに特定のタンパク質との NanoLuc® 融合体を発現する改変細胞株も市販されています（X-MAN™ NanoLuc™ Reporter Cell Lines, Horizon Discovery）。

### 明るいからイメージングにも最適！

細胞や動物個体での生物発光イメージングは NanoLuc® レポーターの明るさとバックグラウンドの低さが有効なアプリケーションの1つで、高感度発光顕微鏡があれば様々な生体内イベントを観察することができます。NanoLuc® でラベルされたウイルスの感染や腫瘍増殖などのイメージングにも利用されています。NanoLuc® レポーターは発光強度が高いため、露光時間を数秒にまで短縮できるので生物発光イメージングに利用する発光タグとして理想的です。また、分子量が小さいため、融合パートナーの正常な生体システムや機能性への影響を最低限に抑えることができます（17 ページ参照）。



生物発光イメージングによる NanoLuc® 融合タンパク質の動態モニタリング

HEK293 細胞に発現するプロテインキナーゼ C-NanoLuc® 融合タンパク質を PMA 処理後にフリマジン (Furimazine) 発光基質を加えてモニタリングした。イメージングには Olympus LV200 Bioluminescence Imager を使用した。  
www.promega.co.jp/nanolucbl1/

**NanoLuc**  
TECHNOLOGY

もっと多くの情報を レポーターの進化 ②

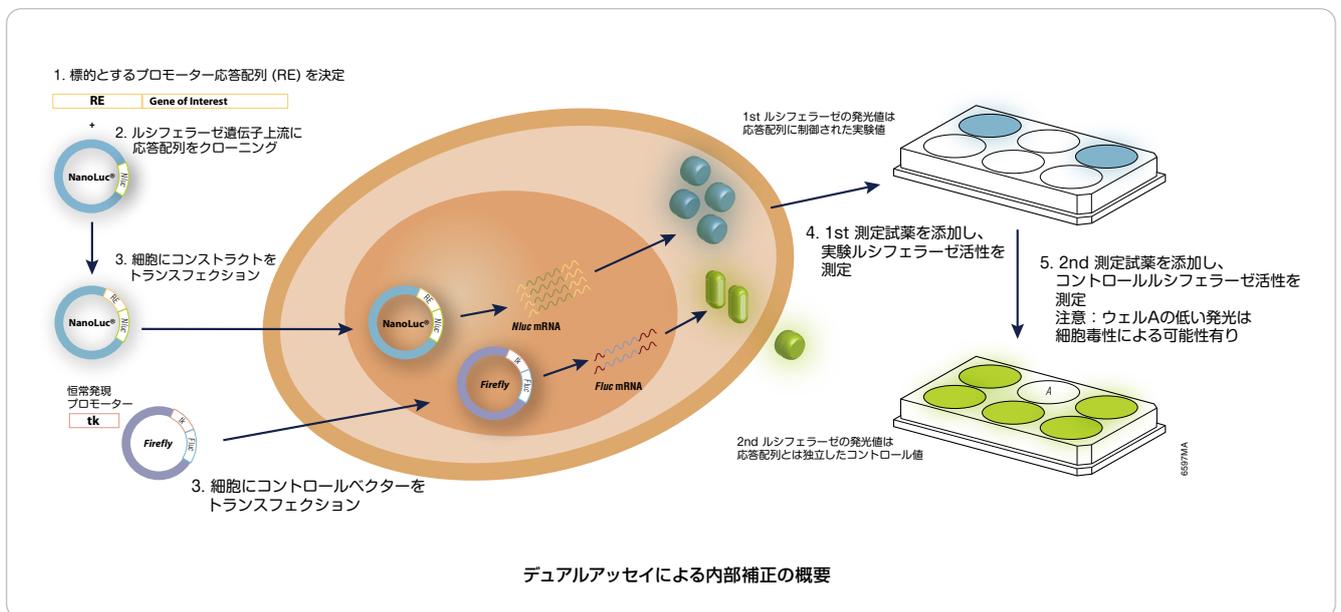
## デュアル レポーター &amp; マルチアッセイ

1つのプレートの各ウェル内で複数マーカーを同時に測定するマルチアッセイは、データの精度を向上させることができると同時に時間や費用を節約することができます。現在、正確な生物学的情報を取得するために、レポーター活性に加えて生存性、アポトーシス、細胞毒性（ネクローシス）などのパラメータについての測定が行われています。これらのパラメータのいくつかを統合あるいは多重化してアッセイすることにより、1回の実験からより多くの情報を得ることができます。2つの異なるレポーター酵素を測定するデュアル-ルシフェラーゼアッセイシステムはプロメガで開発され、分子生物学から細胞生物学における幅広い分野で利用されています。プロメガでは、これまでに蓄積された細胞ベースのアッセイ技術から同時多項目解析を可能にするマルチアッセイ技術の開発を行い、培養細胞を用いた優れたアッセイ系を提案しています。

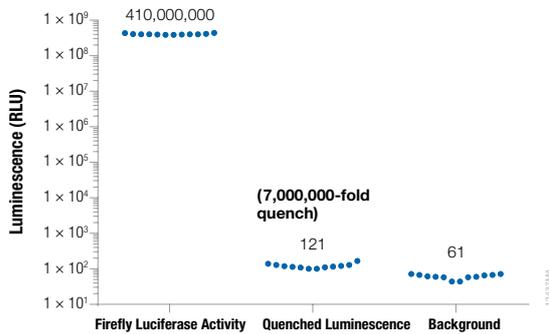
## デュアルレポーターアッセイの有用性

レポーターアッセイを実施するに当たり、一般的にレポーター活性を異なるコンストラクトのベクターや処理条件で比較します。この場合、細胞数やトランスフェクション効率などの変動によってレポーターの発現量も変動する可能性があるため、レポーターデータを標準化する必要があります。

レポーターデータの標準化には、総タンパク質含量、総ATP含量や細胞数に対する補正やコントロールレポーターベクターに対する補正など様々な方法が用いられています。このうち、コントロールレポーターベクターによる補正はトランスフェクション効率とともに細胞数の補正も行えるため、一過性のトランスフェクションでアッセイする場合に最も有用な方法です。



コントロールレポーターベクターは恒常的な活性を持つプロモーターにより第2のレポータータンパク質を発現します。これまでは実験レポーターとしてホタルルシフェラーゼを使うことが多かったため、多くの場合コントロールレポーターにウミシイタケルシフェラーゼが使用されてきました。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基質が異なるため、同一サンプルで連続してアッセイすることができます(22ページ参照)。また、発現量が低いプロモーター、あるいはトランスフェクション効率が低い細胞でもデュアルアッセイが可能な最新型のルシフェラーゼ NanoLuc® とホタルルシフェラーゼを組み合わせた Nano-Glo® Dual-Luciferase® Reporter Assay System が発売されさらにアッセイの幅が広がっています(21ページ参照)。

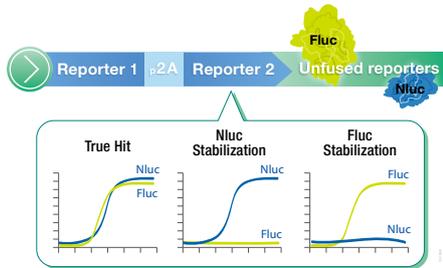


**NanoLuc® Dual の優れたクエンチング効果**

**Firefly Luciferase Activity:** ONE-Glo™ EX Luciferase Assay Reagent (ホタルの基質を含む) の添加によるホタルルシフェラーゼの発光。

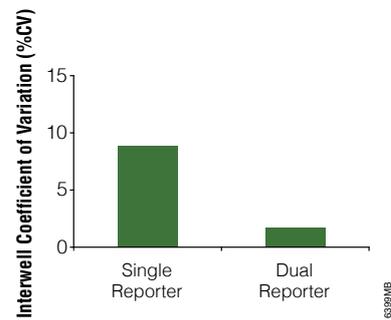
**Quenched Luminescence:** Stop Reagent (消光効果を示すために NanoDLR™ Stop & Glo® Reagent から NanoLuc® 基質を除いたもの) によりホタルの発光はほとんど消失する。

**Background:** バックグラウンドサンプルの発光。

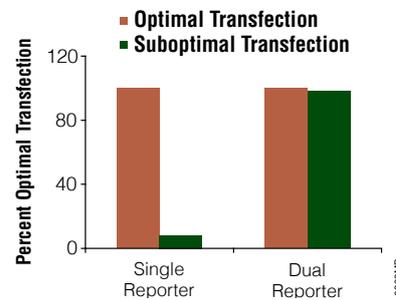


**タンデムレポーターを用いたスクリーニングにおける偽陽性の簡便な検出**

タンデムレポーターベクターは、同じ mRNA 転写産物よりホタルルシフェラーゼと易分解性の NanoLuc® ルシフェラーゼを発現する。2つのレポーターはリボソームスキップ機構を引き起こす短い P2A 配列により2つの未融合の可溶性ルシフェラーゼに分離されるため、より正確な化合物プロファイルの作成が可能となる。



デュアルアッセイによりバラツキの低減 (低い CV%)

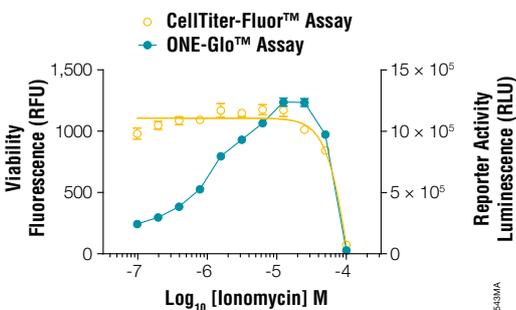


トランスフェクション効率に起因するバラツキの低減

**マルチアッセイの有用性**

アッセイケミストリーの違いによりレポーターアッセイに加え、その他の細胞ベースアッセイを同じ細胞サンプルで実施することにより、細胞応答に関する情報を多く入手することができます。

例えば、薬剤による細胞内パスウェイへの影響を調べる場合に薬剤自体に細胞毒性があるとレポーターアッセイデータの解釈を困難にします。これを回避するために細胞生存試験を並行して行う場合がありますが、そのために実験材料がその分多く必要となってしまいます。レポーターアッセイと細胞生存性試験のマルチアッセイならば1度の実験で2つのパラメーターを測定できるため、実験の精度を高めると同時にコストの増加を抑えます。また、レポーターアッセイとアポトーシスの指標であるカスパーゼ3/7 や P450 活性なども同じサンプルセットより測定することもできます。レポーターアッセイとのマルチアッセイに対応したシステムについては 31 ページをご覧ください。



**細胞生存性試験とシングル - ルシフェラーゼアッセイのマルチアッセイ**

GloResponse™ NFAT-RE-luc2P HEK293(10,000 cells/well, 100 µl/well) を、DMEM/10%FBS (ハイグロマイシン B と、NFAT 転写因子を活性化させる PMA を含む) 培地で希釈したイオノマイシンで処理をした。37℃で6時間処理後、CellTiter-Fluor™ および ONE-Glo™ を用いてアッセイを行った。イオノマイシン高濃度領域の NFAT 転写活性低下が細胞毒性によるものであることが分かった。

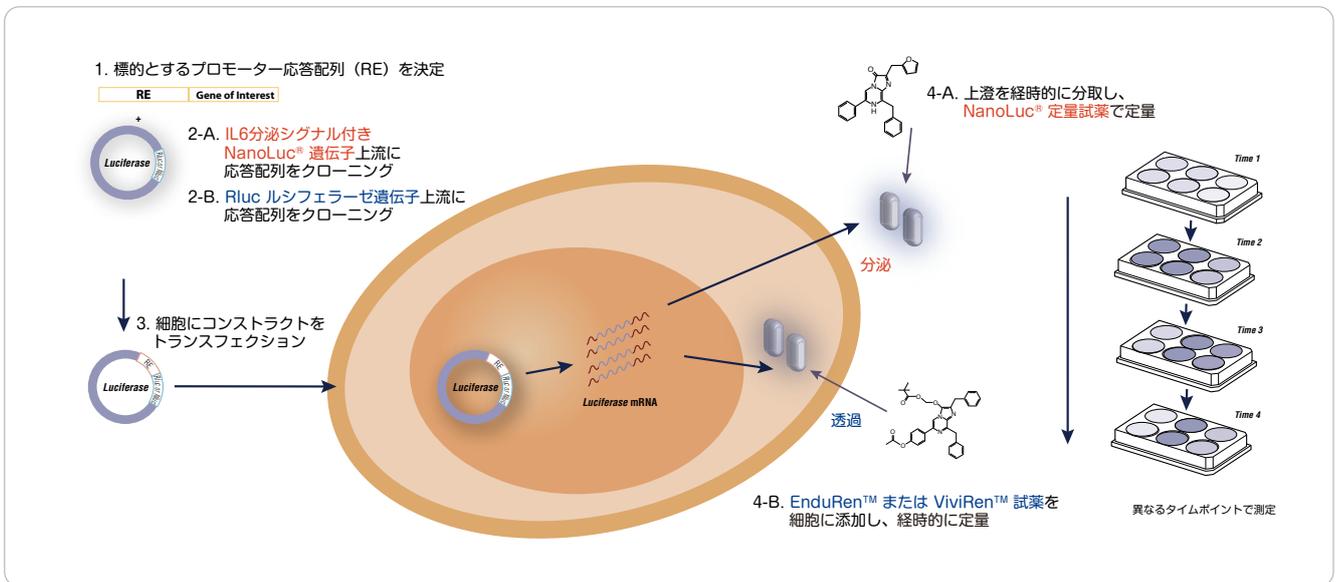
1st アッセイ	2nd アッセイ	追加される情報
RealTime-Glo™	ホタル	細胞生存性 (還元能)
CellTox™ Green	ホタル、ウミシイタケ、NanoLuc®	細胞毒性 (漏出 DNA)
CellTiter-Fluor™	ホタル、ウミシイタケ	細胞生存性 (プロテアーゼ)
EnduRen™ / ViviRen™	ホタル	ウミシイタケルシフェラーゼ (リアルタイム)
MultiTox-Fluor™	ホタル、ウミシイタケ	細胞生存性 & 細胞毒性 (プロテアーゼ)
Apo-ONE® Caspase 3/7	ウミシイタケ [EnduRen™]	アポトーシス活性
P450-Glo™ CYP induction	ホタル	P450 活性

= エンドポイント = リアルタイム

## もっとリアルタイムに レポーターの進化 3

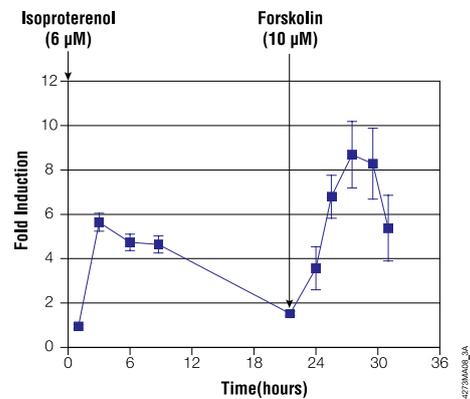
# リアルタイムアッセイ

多くの細胞ベースのアッセイシステムは化合物添加後一定時間をおいたエンドポイントを測定する方式が汎用されていましたが、薬剤の濃度に加え時間のパラメーターを付加することにより細胞内イベントへの理解は飛躍的に高まります。一般的なルシフェラーゼアッセイはシグナルを得るために細胞を破壊して基質を加えていましたが、細胞のタンパク質分泌機構を利用してレポーター酵素を細胞外に放出させる手法やレポーター基質の細胞透過性を高める方法により継続的なアッセイが可能となりました。



## 細胞透過性発光基質 (ウミシイタケルシフェラーゼ)

細胞ベースのアッセイでは細胞への影響を最小限に抑えるように実験が行われていますが、ほとんどのレポーターアッセイでは正確で信頼性のある測定を行うためにエンドポイントで細胞を完全に破壊する方法が用いられてきました。ウミシイタケルシフェラーゼの場合、基質である酸素およびセレンテラジンは毒性が無く、細胞膜を容易に透過できるため生きた細胞のままアッセイすることができます。しかし、これまでのセレンテラジンは水溶液中での安定性が低く、通常の細胞培養条件下での使用は困難で不便な点がありました。EnduRen™ および ViviRen™ Live Cell Substrate (25 ページ参照) はこれらの難問を解決するためにデザインされており、レポーター活性のリアルタイムモニタリングに最適です。



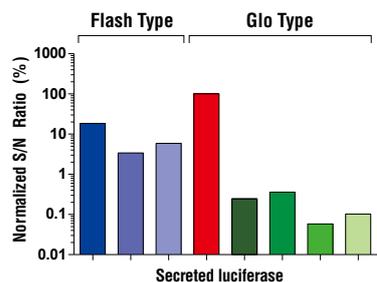
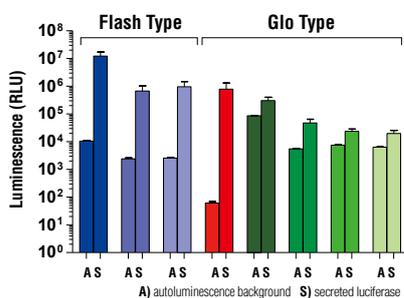
生きた細胞を用いた 24 時間以上のリアルタイム測定

cAMP response element (CRE) に制御された Rapid Response™ ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子をトランジェントに HEK293 細胞へトランスフェクションし、EnduRen™ Live Cell Substrate で処理した。16 時間後、細胞を 6 μM イソプロテレンール (Calbiochem) で処理し、定期的な発光を測定した。さらに約 20 時間後、10 μM フォルスコリン (Sigma) を加え、定期的な測定を繰り返した。細胞は測定しない時間はインキュベータに戻した。データは並行培養した未処理の細胞に対する誘導倍率で示した。各データポイントは n = 6 で標準偏差も示した。

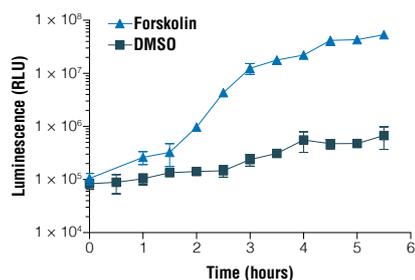
## 分泌型ルシフェラーゼ (NanoLuc®)

分泌型のアッセイは同一サンプルプレートにおける経時的なアッセイやマルチアッセイなど利便性に優れますが、これまで自己発光によるバックグラウンドが大きな課題でした。NanoLuc® は他社の分泌型ルシフェラーゼに比べ自己発光が飛躍的に抑えられているため、高い S/N 比が得られます。NanoLuc® 分泌型ルシフェラーゼ (secNluc) はレポーター遺伝子に IL-6 分泌シグナル配列が付加されており、培地中に分泌された NanoLuc® は細胞を破壊することなく測定することができます。この分泌型 NanoLuc® を利用することにより、経時的なレポーターアッセイ、他の細胞マーカーとのマルチアッセイ、血中に分泌された NanoLuc® を利用した *in vivo* プロモーター活性測定などへの応用が可能です。NanoLuc® の定量試薬については 23 ページ、分泌用ベクターについては 27, 28 ページをご覧ください。

■ 他社A (Flash) ■ Nluc + NanoGlo (Glow) ■ 他社Bf + 10%安定剤 (Glow)  
 ■ 他社Bb (Flash) ■ 他社Ad (Glow) ■ 他社Bf + 16%安定剤 (Glow)  
 ■ 他社Bf + 0%安定剤 (Flash) ■ 他社Bf + 20%安定剤 (Glow)

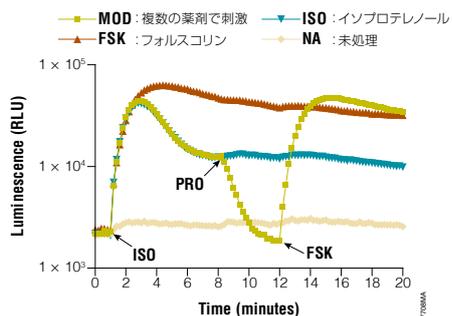
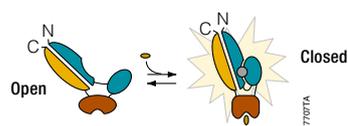


他社分泌型ルシフェラーゼアッセイとの S/N 比の比較



分泌型 NanoLuc® ルシフェラーゼによる経時的な測定

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キネティクスを細胞溶解することなく測定できた。シグナルは GloMax® 96 Microplate Luminometer を用いて測定した。



## GloSensor™ technology

### 生細胞リアルタイムセンサー

レポーター発現量ではなく、レポーター活性そのものを変化させることができれば、もっと迅速な反応を検出することができます。GloSensor™ はまさにこのような活性変化タイプのセンサーであり、簡便なプロトコルで生細胞内のリアルタイムなターゲット分子検出が可能です。

cAMP と cGMP のセンサーが開発済みであり、プロテアーゼ活性のセンサーも開発中です。

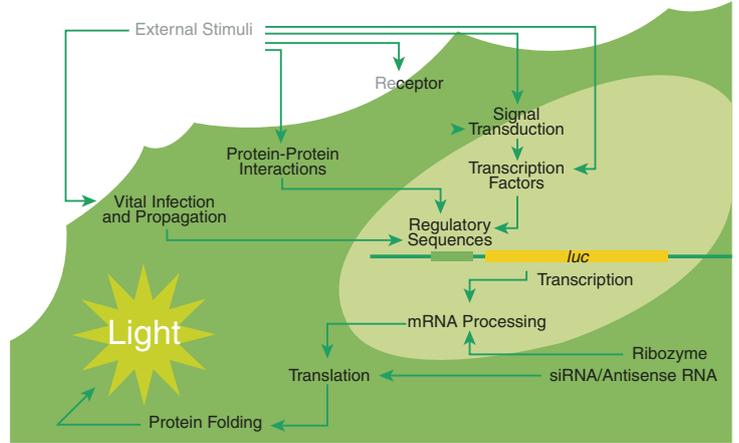
GloSensor™ については 29 ページをご覧ください。

### アロステリック cAMP バイオセンサー

生細胞 (37°C) におけるシグナルのカイネティクスとセンサーの可逆性。cAMP バイオセンサーを一過性に発現する HEK293 細胞を 10 μM イソプロテレノール (ISO)、10 μM プロプラノール (PRO) または 10 μM フォルスコリン (FSK) で連続的に処理した (n = 3)。Fan, F. *et al.* (2008) ACS Chem. Biol. 3, 346-51. より許可を得て転載した。

## 生体内システムをしらべるための発光生物システム

レポーター実験は、細胞内現象の変化を検出可能なシグナル（ルシフェラーゼ発光など）に変換し、検知するための実験方法です。通常、細胞内イベントの変化に応答してレポーターの転写活性を調節する配列（例：プロモーター/エンハンサー、その他の転写因子結合配列など）をレポーター遺伝子に接続したベクターを細胞内に導入します。薬剤投与などの刺激により細胞内イベントが変化すると、それに応じてレポーター遺伝子が転写/翻訳されます。細胞内に蓄積されたレポータータンパク質は容易に定量することができます（右図参照）。ルシフェラーゼはバックグラウンドが低く高感度な測定ができ、操作がシンプルであるためレポーターとして理想的です。また、翻訳後修飾をとまわずに活性を持つため、より直接的に転写活性をシグナルに変換することができます。

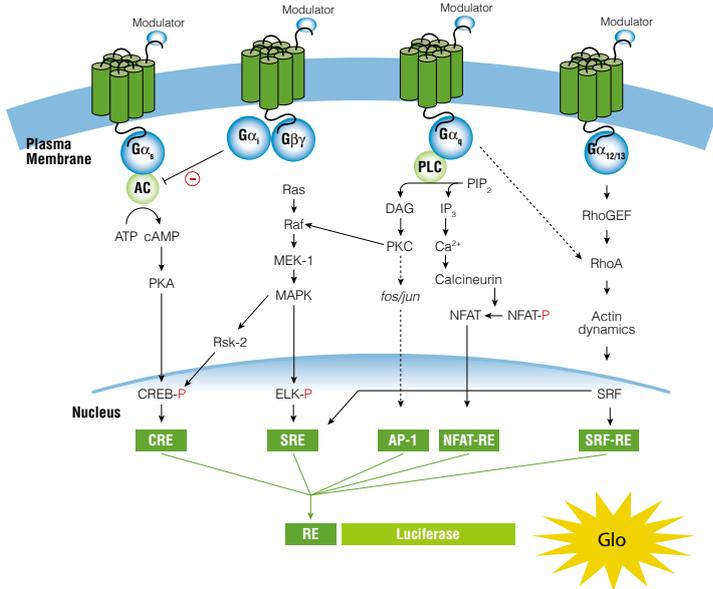


ルシフェラーゼレポーターの利用

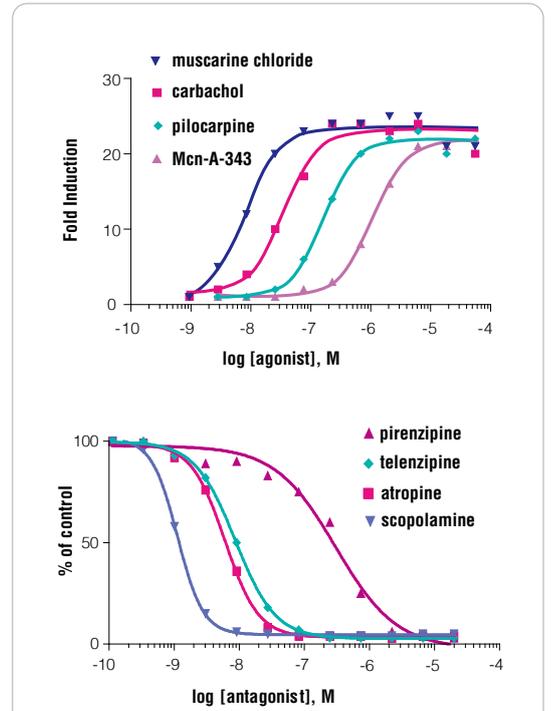
## シグナルパスウェイ解析

### GPCR パスウェイ

ルシフェラーゼレポーターは、シグナル伝達経路の研究や GPCR などの受容体活性を制御する物質の探索に有効です。例えば、細胞内の cAMP レベルを調節している受容体の挙動は、一般に cAMP 応答配列 (CRE) によってルシフェラーゼの転写と連動します。これらの応答配列を含むルシフェラーゼレポーターを用いて、各種 GPCR パスウェイの解析が可能です。ホタルルシフェラーゼの内部に cAMP 結合タンパク質の一部を挿入し、cAMP レベルをモニタリングできる GloSensor™ (cAMP センサー) については 9, 29 ページをご覧ください。



ルシフェラーゼレポーターを利用した GPCR シグナル伝達経路の解析

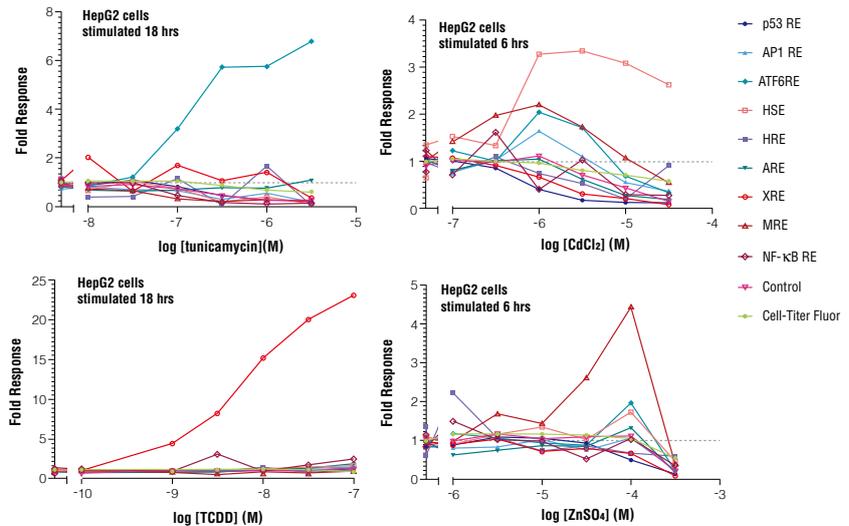


アゴニスト及びアンタゴニストの解析

pGL4-NFAT-luc2P と pF9A-M3R-hRluc-Neo を安定発現する HEK293 細胞に対し、各種因子を添加し 6 時間培養後、Dual-Glo™ Assay System (カタログ番号 E2920) で発光測定を行った。

## ストレスシグナルパスウェイ

細胞は化学物質による毒性のほか、紫外線、放射線、温度、物理的刺激など様々なストレスに絶えずさらされています。これらのストレスには細胞内のストレス応答機構が反応することが分かっています。レポーターアッセイは、このようなストレス応答機構を含め、細胞の広範なシグナル経路の解析ができます。プロメガでは種々の細胞ストレスに対する応答エレメントを搭載した、レポーターベクターシリーズを開発しました。これらのベクターを用いたレポーターアッセイにより、細胞ストレスのシグナル伝達経路の特定、各種細胞のストレス耐性の検討、ストレス化合物の毒性評価などの解析が可能です。



同一プレートでのストレス応答パネルに対する化合物プロファイリング

HepG2 細胞に各ストレス応答配列を含む DNA をトランスフェクションした後、96 ウェルプレートに移し 0/N でインキュベーションした。各化合物で処理し、CellTiter-Fluor™ で細胞生存性を蛍光で測定した後に ONE-Glo™ でルシフェラーゼレポーターを測定した。

## 各種シグナルパスウェイ

プロメガでは様々な転写因子、シグナルパスウェイに対応する応答配列を含むルシフェラーゼ応答ベクターをご用意しています。がん研究、免疫学、発生生物学、薬物代謝等様々な研究分野における主要なシグナルパスウェイの解析に応用できます。各種パスウェイ解析用ベクターについては 26, 27 ページをご覧ください。

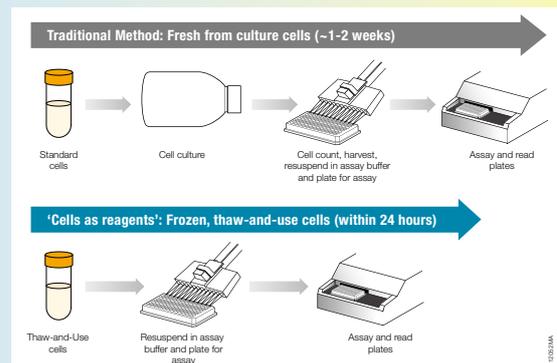
転写因子	応答エレメント	シグナル経路
<b>GPCR シグナル伝達経路</b>		
CREB	CRE	cAMP / PKA
NFAT	NFAT RE	カルシウム / カルシニウリン
ELK / SRF	SRE	MAP / ERK
SRF	SRF RE	RhoA
AP1	AP1 RE	MAPK / JNK
<b>ストレスシグナル伝達経路</b>		
Nrf2	ARE	酸化ストレス
p53	p53 RE	DNA 損傷
ATF6	ATF6 RE	小胞体ストレス
ATF4	ATF4 RE	小胞体ストレス
MTF1	MRE	重金属ストレス
HSF1	HSE	熱ショック
Hif1 $\alpha$	HRE	低酸素
AhR	XRE	生体異物ストレス
AP1	AP1 RE	MAPK / JNK
<b>薬物代謝</b>		
	3A4	シトクロム P450 / 薬物代謝
	2B6	シトクロム P450 / 薬物代謝
<b>各種シグナル伝達経路</b>		
NF- $\kappa$ B	NF- $\kappa$ B RE	NF- $\kappa$ B
STAT1 : STAT2	ISRE	INF- $\alpha$
STAT3 : STAT3	SIE	IL-6
SMAD3 : SMAD4	SBE	TGF- $\beta$
LEF / TCF	LEF-TCF RE	Wnt
STAT5 : STAT5	STAT5 RE	IL-3
GLI	Gli RE	ヘッジホッグ
STAT1 : STAT1	GAS RE	JAK / STAT1 IFN- $\gamma$
	C / EBP RE	複数経路
TCF-LEF	TCF-LEF RE	Wnt
STAT4	STAT4-RE	JAK / STAT4 IL12
Myc : Max	Myc	Myc
RBP-Jk	RBP-JK-RE	Notch
NF- $\kappa$ B	hIL8	IL1
STAT1 : STAT2	hIL8	T 細胞活性化, IL1
STAT3 : STAT3	hEGR1	NGF
	hID1	TGF- $\beta$ / BMP
	PSA-long	アンドロゲン活性化 (前立腺がん)
	GCSF	STAT3

## Cell as Reagent 細胞は検出試薬だ!

タンパク質や抗体など、バイオ医薬品の生物活性をモニターする方法はおおまかにセルフリーアッセイと細胞アッセイに分けられます。わずかなタンパク質構造 / 修飾の違いがもたらす Potency の違いを見分ける能力は細胞アッセイが圧倒的に優れています。その反面、細胞は培養の手間や品質がバラつくという欠点があります。

細胞を凍結ストックとして保存し用時に溶かしてそのまま使う Thaw and Use format は、細胞培養に起因するこの欠点をなくし、細胞の高性能と試薬の使いやすさをあわせた新しい使い方です。

プロメガでは ADCC Reporter Bioassay でこの方式を採用しています。ぜひ Thaw and Use format を体験してください! (29 ページ参照)



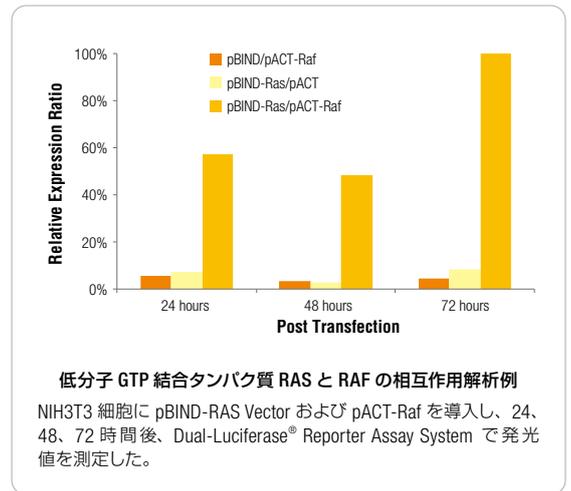
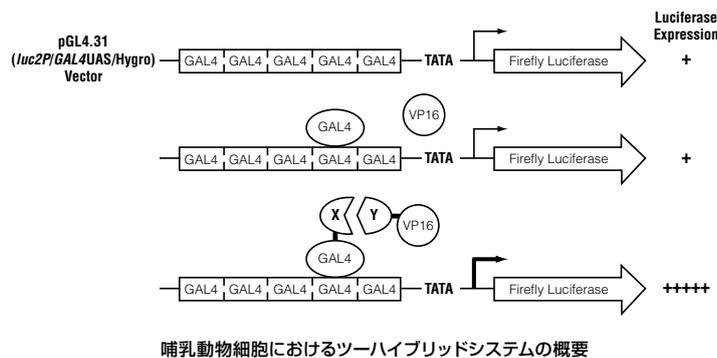
## タンパク質間相互作用 (PPI 解析)

タンパク質 – タンパク質相互作用を調べる方法には、多くの手法があります。中でも生細胞でのネイティブな状態での相互作用を検出する方法としてツーハイブリッド法および BRET 法があります。プロメガではこれらの手法をルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイで、より簡便に、正確に、感度よくタンパク質間相互作用を測定するツールをご用意しております。

### ツーハイブリッドシステム (哺乳動物細胞)

ツーハイブリッド法は、酵母を使用する系として開発された方法です。酵母細胞は取扱いが容易な反面、高等生物のモデルとして使うには限界があります。そこで、哺乳類細胞を用いたツーハイブリッド法 (mammalian two hybrid: M2H) が開発されてきました。この方法は、基本原理は酵母ツーハイブリッド法と同様で、転写因子が DNA 結合ドメインと転写活性ドメインに分離できるモジュール構造を利用するものです。哺乳類の培養細胞を用いる実験系であるため次のような利点があります。

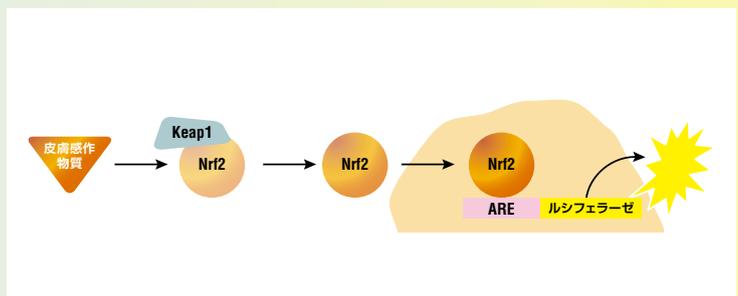
- 目的に合った細胞株を利用することができます。
- 酵母細胞の実験系では細胞に発現ベクターを導入してから結果の判定を行うのに 3 – 4 日かかるのに対し、哺乳動物培養細胞を用いた場合トランスフェクション後 1 – 2 日で結果を得ることができます。



プロメガの CheckMate™ / Flexi® Vector Mammalian Two-Hybrid System は、2 つのタンパク質あるいはドメイン同士の相互作用をレポーターアッセイで評価するためのシステムで、細胞ベースのアッセイを行うためのステイブルな細胞株構築にも使用できます。まず目的の哺乳動物タンパク質をコードする遺伝子をクローニングし、細胞に導入するとネイティブな細胞内環境でタンパク質の発現および翻訳後修飾が起こります。酵母のツーハイブリッドシステム同様に目的タンパク質の 1 つ (“Bait”) を DNA 結合ドメインと融合させ、もう片方のタンパク質 (“Prey”) を転写活性ドメインと融合させるように設計します。ツーハイブリッド用のベクターについては 29 ページをご覧ください。

### アプリケーション: KeratinoSens

KeratinoSens™ (Givaudan 社が開発) は皮膚感作性を調べるための *in-vitro* 試験法として化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用されています。この手法の原理は ARE 応答配列を利用したレポーターアッセイです。従来はマウス等の動物を用いて皮膚感作性試験が行われていましたが、近年、動物実験代替法としてこのような *in vitro* の試験手法が一般化されつつあります。

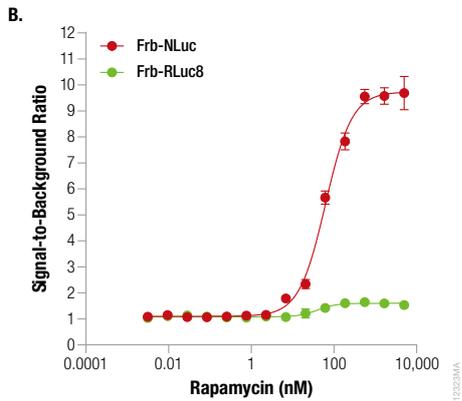
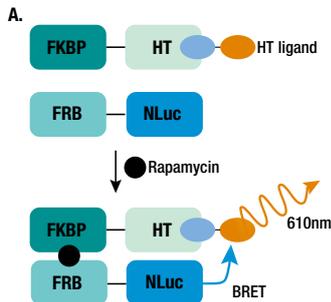


## BRET (生物発光共鳴エネルギー移動)

生物発光共鳴エネルギー移動 (Bioluminescence resonance energy transfer) は、生細胞におけるタンパク質間の直接的な相互作用を検出する手法として幅広く用いられています。類似の原理である FRET (Fluorescence resonance energy transfer) を用いた手法に比べ、励起光を当てる必要がないので、バックグラウンドがきわめて低く、励起光による細胞へのダメージを最小限に抑えることができます。発光源にプロモメガが新しく開発したルシフェラーゼ NanoLuc<sup>®</sup> を用いた NanoBRET<sup>™</sup> system は従来のウミシイタケルシフェラーゼを用いた BRET に比べ、より高い発光値と安定性、強固性を持ち、生細胞でのリアルタイム解析、及びハイスループットスクリーニングに最適です。

### NanoBRET<sup>™</sup> の特徴

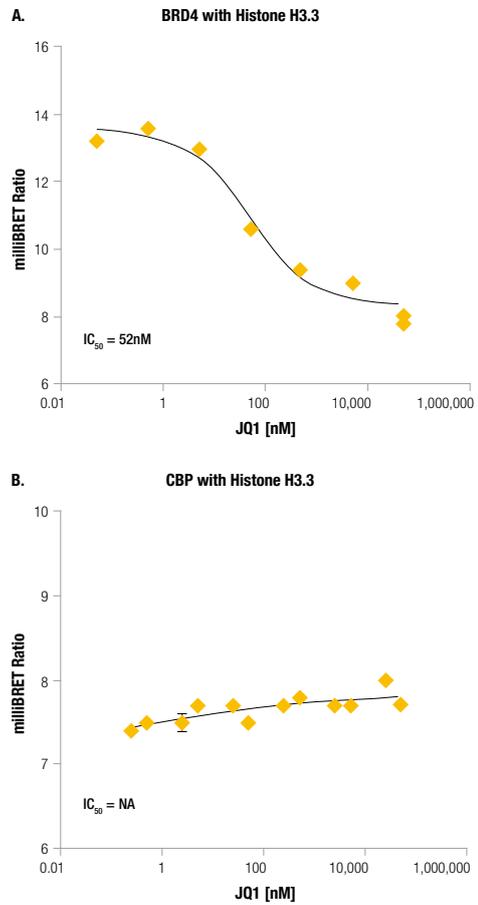
ドナー	NanoLuc <sup>®</sup>
アクセプター	HaloTag <sup>®</sup> 618 ligand
基質	Furimazine
ドナーエミッションピーク (nm)	460
アクセプターエミッションピーク (nm)	618
ストークシフト (nm)	158



BRET アッセイにおける NanoLuc<sup>®</sup> および ウミシイタケルシフェラーゼのパフォーマンス比較

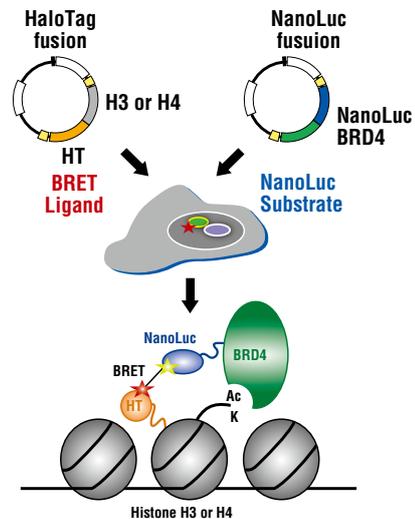
パネル A: 実験スキーム。FKBP12-ラパマイシン複合体はラパマイシン存在下、mTOR の FRB (FKBP12-Rapamycin Binding) ドメインに直接結合した。FKBP は HaloTag<sup>®</sup> と融合しており、HaloTag<sup>®</sup> を蛍光 NanoBRET<sup>™</sup> リガンドで標識した (共有結合)。FRB には NanoLuc<sup>®</sup> または *Renilla* ルシフェラーゼを融合させた。

パネル B: ラパマイシン濃度を増加させながら FKBP と FRB の相互作用を BRET により検出した。



ヒストン-プロモドメインの阻害実験例

プロモドメインのアセチルリジン認識モチーフに拮抗的に結合する細胞膜透過性低分子化合物 (JQ1) による、ヒストン-プロモドメインの阻害効果を NanoBRET<sup>™</sup> により定量化した。



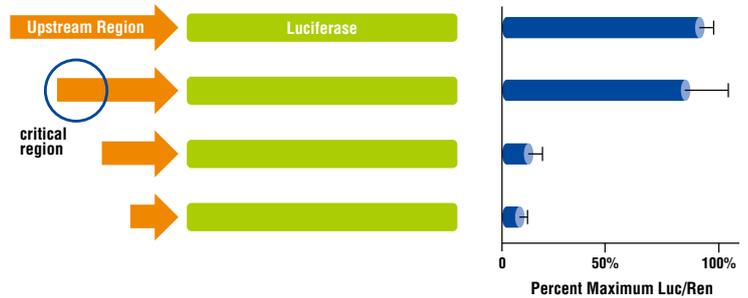
Pre-Designed NanoBRET<sup>™</sup> PPI Assays

プロモメガでは主要なタンパク質間相互作用の組み合わせとして、ヒストン-プロモドメイン、HDAC1-2、p53、Myc、EGFR 等の最適化済みベクターセットおよび試薬のカスタム製品 Pre-Designed NanoBRET<sup>™</sup> PPI Assays をご用意しています。

詳細については 25 ページをご覧ください。

## プロモーター解析

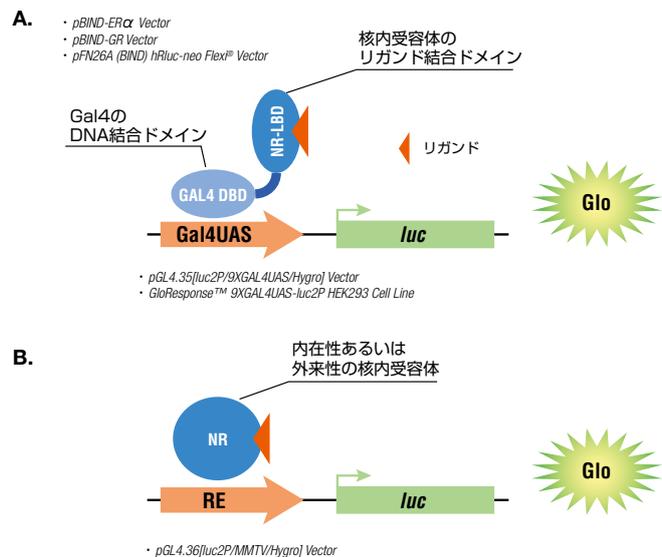
ルシフェラーゼアッセイを用いたプロモーター解析は転写制御の一般的な手法として、広範な分野で用いられています。ルシフェラーゼ遺伝子上流に目的のプロモーターを挿入することにより、そのプロモーターの活性を解析することができます。目的プロモーターの欠損体および変異体を解析することにより、そのプロモーターで重要な働きをする領域および塩基を特定することができます。



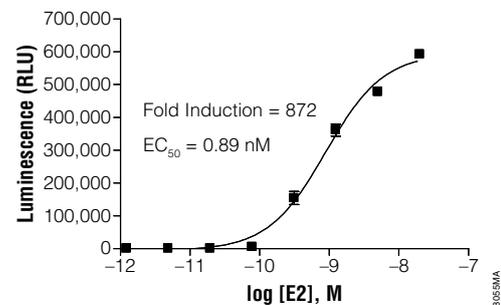
プロモーター欠損体を用いたルシフェラーゼアッセイ

## 核内受容体解析

核内受容体はステロイドやその他の分子が細胞内に存在することを感知するリガンド調節性転写因子の一種です。核内受容体は通常細胞質中に局在し、レギュレータと会合した複合体を形成するものもあります。受容体はリガンドとの結合が引き金となり核内に移行し、DNA結合ドメインを介してゲノムDNAの標的部位に結合します。DNAとの結合は、隣接する遺伝子を正の調節へと導き、リガンドの存在に対する細胞内応答を誘導します。哺乳動物細胞における核内受容体の細胞内活性研究に使用される方法の1つとしてルシフェラーゼレポーターアッセイを利用したワン・ハイブリッドシステムがあります。このシステムでは核内受容体リガンド結合ドメイン(LBD)を酵母のGAL4転写因子のDNA結合ドメインに融合させます。ハイブリッド融合タンパク質である核内受容体はその後、GAL4 UAS (GAL4 Upstream Activator Sequence : 1) の9回繰り返し配列により制御される luc2P ルシフェラーゼレポーターの転写を活性化します。核内受容体解析用ベクターについては26, 29ページをご覧ください。



核内受容体によるシグナル解析のための2つのアプローチ



ワン・ハイブリッドシステムを利用したエストロゲンの定量解析

9XGAL4UAS-luc2P を安定発現する HEK293 細胞 GloResponse™ 9XGAL4UAS-luc2P HEK293 cells に pBIND-ER-alpha Vector を導入し、各濃度の E2 エストラジオールを添加した。添加 24 時間後にルシフェラーゼ活性を Dual-Glo™ Luciferase Assay System で定量した。

## タンパク質安定性解析

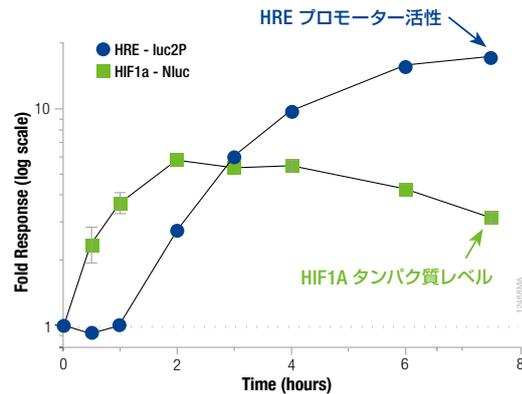
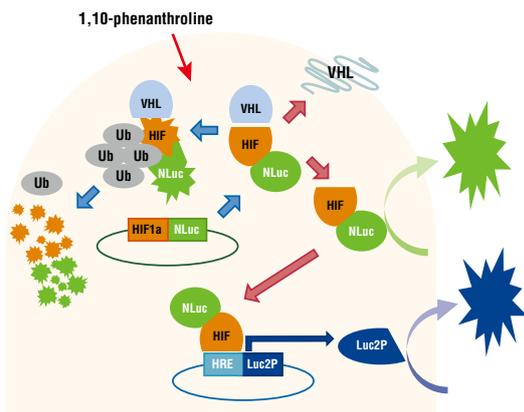
タンパク質のターンオーバーのスピードは、発がんやストレス応答に関わる多くのシグナルタンパク質を制御しています。下流の転写イベントが活性化した結果として細胞の状態が変化し、これに反応してタンパク質の安定化とそれに続く蓄積が起こります。目的タンパク質とルシフェラーゼの融合タンパク質を用いることにより、タンパク質の安定性および蓄積を発光値として定量化できます。

レポーターアッセイはストレス応答メカニズムを解析する強力なツールとして利用されてきました。転写応答はシグナルの終点で起こるため、低分子モジュレーターに対する細胞の総体的な応答を測定する上で非常に簡便であり、これまで薬剤のスクリーニング等に汎用されてきました。一方で薬剤は転写活性化のはるか上流のシグナルイベントで作用することが多く、分子標的を見つける上ではレポーターアッセイでは困難な場合があります。NanoLuc® と調節タンパク質の融合体の細胞内レベルをモニタリングすることでシグナル上流での変化を迅速にとらえることができ、従来のレポーターアッセイを補完する情報を得ることができます。

NanoLuc® Stability Sensor (カタログ番号 N1381, N1391 : 28 ページ) は ready-to-use のベクターシステムであり、NanoLuc® luciferase reporter の特長を活かし、キーとなる2つのシグナルタンパク質 HIF1A と NRF2 の安定性の検討を可能にしました。

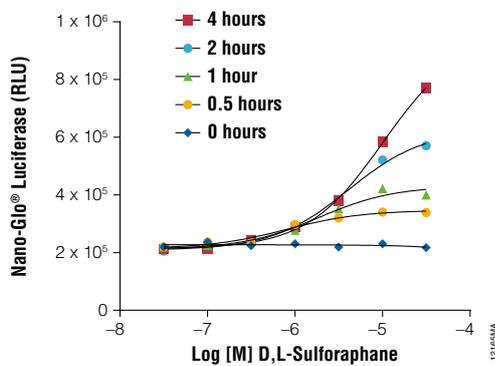
**NRF2 Vector System :** NRF2 は酸化ストレスに対する細胞の応答を仲介するシグナルタンパク質です。NRF2 Vector System では細胞内 NRF2 タンパク質レベルを簡便に定量し、その動態を検討することが可能です。NanoLuc® を C 末端に融合した NRF2 タンパク質を CMV プロモーターの下流にコードしたベクター、細胞内 NRF2 レベルを適切に制御するための pKEAP1 発現ベクター、細胞内での融合タンパク質の発現量を調節するための Transfection Carrier DNA を含むシステムです。

**HIF1A Vector System :** HIF1A は低酸素に対する細胞の応答を仲介するシグナルタンパク質です。HIF1A Vector System では細胞内 HIF1A タンパク質レベルを簡便に定量し、その動態を検討することが可能です。NanoLuc® を C 末端に融合した HIF1A タンパク質を CMV プロモーターの下流にコードしたベクター、細胞内での融合タンパク質の発現量を調節するための Transfection Carrier DNA を含むシステムです。



タンパク質ダイナミクスと遺伝子発現のデュアルアッセイ

HEK293 細胞に pNLF1-HIF1A [CMV/neo] 融合タンパク質発現コンストラクトと低酸素応答エレメントを含む pGL4.42 [luc2P/HRE/Hygro] を 1:1000 の割合でトランジェントにトランスフェクションした。18 時間後に様々な濃度の 1,10-フェナントロリンで刺激し、ホタルルシフェラーゼ転写レポーターと Hif1a-NanoLuc® 融合タンパク質を Nano-Glo® Dual-Luciferase® Reporter (NanoDLR™) Assay で表示の時点で定量した。



NRF2 タンパク質の安定性試験

96 ウェルプレートで HCT-116 細胞に pNLF1-NRF2 [CMV/neo] Vector および pKEAP1 DNA をトランジェントにトランスフェクションした。細胞は表示の時間で異なる濃度の D, L スルフォラファンで刺激した後、Nano-Glo® Luciferase Assay Reagent および GloMax® 96 Microplate Luminometer を用いて NanoLuc® ルシフェラーゼを測定した。

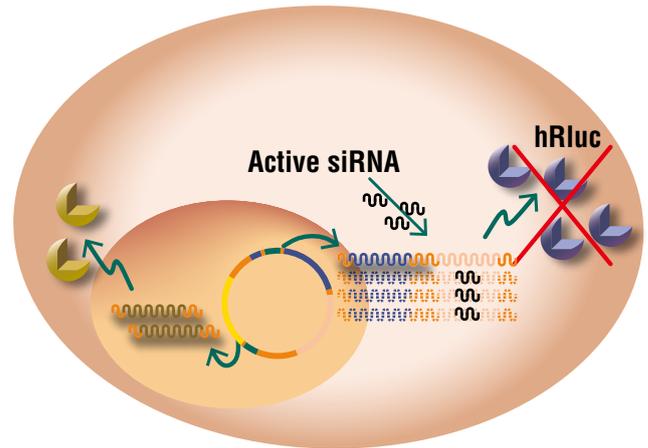
### 主要シグナルパスウェイの調節タンパク質のパスウェイ活性化にともなう細胞内寿命の変化

標的タンパク質	通常時 T1/2 (分)	誘導時 T1/2 (分)	誘導剤
HIF1 α	50	200 – 250	低酸素
IκB α	100	5	TNF α / その他の炎症性サイトカイン
p53	20	300 – 400	遺伝毒性ストレス (UV / 化学物質 DNA 損傷, etc.)
Nrf2	10 – 15	30 – 40	酸化ストレス
β -Catenin	<60	>200	Wnt
FOXO	>300	<60	成長因子
PDCD4	300	<60	インシュリン / PI3K
c-Jun	<60	>200	ストレス
c-Myc	20	300 – 400	ストレス
c/EBP	<60	>300	LiCl

## RNA 干渉解析

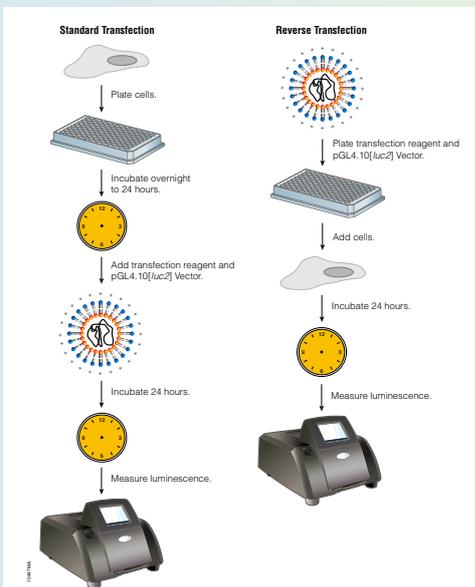
siRNA や microRNA などのノンコーディング RNA の機能解析は転写調節、細胞の発生、分化、増殖、がん化およびアポトーシスなどの細胞機能解析において重要です。プロメガではこれらの RNA 干渉をルシフェラーゼアッセイにより解析するシステムをご用意しております。ルシフェラーゼの発光を利用することにより、GFP やフラッグ-タグなど、その他の融合法によるアプローチと比べ、より便利、迅速に感度の高い定量が行えます。

psiCHECK™-1 および psiCHECK™-2 Vectors は、RNA 干渉実験初期段階における最適化を定量的、迅速に行うためにデザインされています。標的遺伝子と融合されたレポーター遺伝子の発現変化をモニタリングします。両ベクターとも第1レポーター遺伝子としてウミシイタケルシフェラーゼが利用されており、目的の遺伝子はマルチクローニング領域にクローニングします。目的遺伝子に対する合成 siRNA または *in vivo* で発現した shRNA による RNA 干渉機構が開始されると、標的遺伝子とつながるウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子も切断、分解されます。これにもなうウミシイタケルシフェラーゼ活性の減少を測定することにより、簡便に RNA 干渉効果をモニタリングすることができます。RNA 干渉に関連するベクターについては 29 ページをご覧ください。



## MiCheck miRNA バイオセンサークローン

MiCheck miRNA バイオセンサークローンは microRNA 標的配列 (代表的なヒト 157 種、マウス 32 種) をプロメガの psiCHECK™-2 Vector に挿入した microRNA 評価用クローンです。各組織や未分化細胞で発現の高い microRNA そして疾患 (主にがん) と関連性のある microRNA を選抜しています。各 microRNA 標的配列は SV40 プロモーター制御下にあるウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子の停止コドンの下流、3' 非翻訳領域に挿入しています。このため、microRNA 標的配列を含んだウミシイタケルシフェラーゼ転写物が発現します。ウミシイタケルシフェラーゼ転写物は検討対象の microRNA によってその翻訳が影響を受けるので、その結果を発光値として検出することができます。ルシフェラーゼレポーターにより、細胞増殖・分化過程および様々な細胞処理条件 (刺激条件、薬剤処理など) について、細胞培養ウェル内で直接、簡単に機能性 microRNA を評価することができ、様々な細胞の活性型 microRNA のバイオセンサーとして使用できます。お見積り、注文方法等については [www.promega.co.jp/micheck/](http://www.promega.co.jp/micheck/) をご覧ください。



## リバーストランスフェクションで実験短縮

接着細胞はプレートに接着していないとトランスフェクションできない。そう考えてはいませんか？ 実はそんなことはありません。懸濁状態の細胞にトランスフェクトするリバーストランスフェクションという手法があります。やり方は簡単。通常プロトコールではプレート上の細胞に DNA:トランスフェクション試薬複合体を添加しますが、リバーストランスフェクションではプレート上の DNA:トランスフェクション試薬複合体に細胞懸濁液を添加するだけです。

細胞をプレートに播種しておくというステップが不要なため、リバーストランスフェクションすれば実験短縮できるのです。通常プロトコールより毒性がでやすい、導入効率が低いなどの欠点もありますが、良い条件が見つければ実験がぐっと楽になります。

プロメガの試薬はすべてリバーストランスフェクションに対応しています。あなたも試してみませんか？

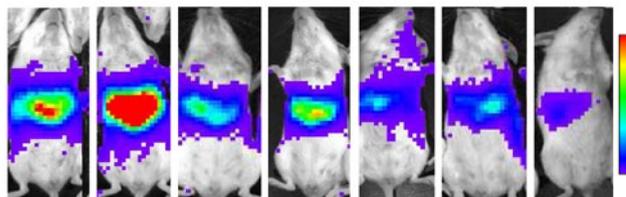
<http://www.promega.jp/resources/pubhub/reverse-transfection-using-fugene-6-and-fugene-hd/>

## In Vivo イメージング & ウイルスパッケージング

ルシフェラーゼ発光を利用した高感度なアッセイ系は生体分子、生体活性を定量する上で非常に強力なツールとして認知されています。ホタルルシフェラーゼ反応で生じる光には生体を透過しやすい赤色側の光が含まれているため、個体を用いた *in vivo* イメージングにも応用されています。ルシフェラーゼ発光は生体に影響を及ぼす可能性のある励起光を必要とせず、生体内に透過する毒性の低い基質のみを必要とします。さらに、GFP によるイメージングでは励起光の届かない生体深部のイメージングもルシフェラーゼでは可能です。また、生物発光イメージングは蛍光イメージングに比べ、シグナル/ノイズ比と感度の高さが特長です。

最新の NanoLuc® レポーターは高い感度と低いバックグラウンドを特長としています。表層組織でのイベントを中心としたイメージング事例があります。また、基質の特異性を利用した NanoLuc® とホタルルシフェラーゼによるデュアルルシフェラーゼイメージングも可能です。腫瘍の増殖やウイルスの複製・拡散イメージングなど様々なアプリケーションに応用されています。

※ NanoLuc® ルシフェラーゼは短波長の波長となるため、深部でのイメージングには注意が必要です。詳細については、テクニカルサービス部 (prometec@jp.promega.com) までお問い合わせください。



ルシフェリンを用いたマウス個体の *In Vivo* イメージング

### In Vivo イメージング

*in vivo* での動物個体イメージングで NanoLuc® と他のルシフェラーゼのパフォーマンスを比較し、*in vivo* でのホタルと NanoLuc® のデュアルイメージングアッセイを実施した初めての論文をご紹介します。

本論文では新しい NanoLuc® ルシフェラーゼとホタルルシフェラーゼを用いて培養細胞およびマウスモデルにおける細胞内シグナリングイベントのイメージングについて述べられています。著者らは 2 種類のルシフェラーゼを用いて TGF- $\beta$  1 シグナルパスウェイの中の異なるイベントをイメージングしています。このデータでは TGF- $\beta$  シグナルの 2 つのポイント(受容体活性と転写)の活性化と阻害を定量化しています。ホタルルシフェラーゼレポーターを TGF- $\beta$  1 受容体のキナーゼ活性検出用に、NanoLuc® ルシフェラーゼレポーターを TGF- $\beta$  依存的な転写活性検出用にそれぞれデザインし、TGF- $\beta$  または特異的阻害剤による影響のモニタリングに成功しています。このデュアルアッセイは細胞と動物個体で成功しています。

また、異なる実験では NanoLuc® だけを用いてマウスにおける腫瘍の増殖と進行をイメージングし、他の低分子ガウシアルシフェラーゼ (Gaussia) と比較しています。さらに、著者らはホタルと NanoLuc® ルシフェラーゼを共発現するがん細胞を用いて組織表層部と深部の癌の進行モニタリングについて比較しています。

1. Stacer, A.C., Nyati, S., Moudgil, P., Iyengar, R., Luker, K.E., Rehemtulla, A., and Luker, G.D. (2013) Mol. Imaging 12 (7) , 1-13.

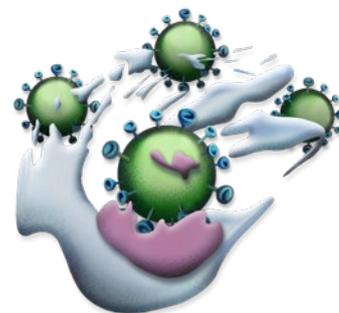
### ウイルスのマーキング

ウイルスにレポーター遺伝子を導入する場合、ゲノムサイズが制限要因となることが多くあります。NanoLuc® ルシフェラーゼは分子量が小さいため、この問題を解決できる可能性があります。近年、NanoLuc® ルシフェラーゼによりインフルエンザおよびアルファウイルスレポーターの作製に成功したという論文が報告されています。

インフルエンザレポーターウイルスの作製は、ウイルスゲノムが小さく、しかも全ての遺伝子が感染に重要であるため非常に困難を伴います。これまでのレポーター遺伝子は大きすぎるため、ウイルスの複製や感染能力に影響を与えずに既存遺伝子との交換、挿入は困難であり、他のルシフェラーゼを用いたこれまでの試みではウイルスの弱毒化やレポーター遺伝子の不安定化が認められていました。Tran ら (2013) は NanoLuc® ルシフェラーゼを用いて病原性を維持した安定なインフルエンザレポーターウイルスの作製に成功し、生きたマウスを用いた生物発光イメージングでは感染 2 日後でも発光が検出され、ブランクアッセイよりも高感度に検出されることを報告しています。明るい光は感染初期段階でも感度よく検出することができ、サイズの小ささは遺伝子サイズが問題となる際のレポーターの構築に有利です。また、Sun ら (2014) は NanoLuc® やホタルルシフェラーゼなどを用いたアルファウイルスレポーターコンストラクトの有効性を比較しています。NanoLuc® およびホタルルシフェラーゼのコンストラクトを用いた場合、感染後 24 または 48 時間後のマウスの *in vivo* イメージングでは、ホタルでは注入部位にのみでシグナルが観察されたのに対して NanoLuc® では全身にシグナルが認められ 48 時間まで増加し続けたことにより、NanoLuc® の有用性が示された結果となりました。

1. Tran, V., Moser, L.A., Poole, D.S., and Mehle, A. (2013) Highly sensitive real-time *in vivo* imaging of an influenza reporter virus reveals dynamics of replication and spread. J. Virol. 87 (24) , 13321-9.

2. Sun, C., Gardner, C.L., Watson, A.M., Ryman, K.D., and Klimstra, W.B. (2014) Stable, High-Level Expression of Reporter Proteins from Improved Alphavirus Expression Vectors To Track Replication and Dissemination during Encephalitic and Arthritogenic Disease. J. Virol. 88 (4) , 2035-2046.



## レポーターアッセイ実験の流れ

ステップ	実験系選択	レポーター & ベクター選定	ベクター挿入配列選定
選択肢	<p><b>発現様式</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>一過性発現 / 安定発現</li> </ul> <p><b>レポーターの数</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>シングル / デュアル</li> </ul>	<p><b>レポーター</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>ホタル / ウミシイタケ / NanoLuc®</li> <li>分解促進配列 有 / 無</li> </ul> <p><b>薬剤選択マーカー</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Neo / Hygro / Puro</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>プロモーター / 応答配列 / 3' UTR</li> <li>全長 / 一部</li> </ul>
お勧めキット		<ul style="list-style-type: none"> <li>pGL4 ベクターシリーズ (26 ページ)</li> <li>pNL ベクターシリーズ (27 ページ)</li> <li>その他レポーターベクター (27 ページ)</li> </ul>	

### 実験系選択

一過性発現	標的配列の選定や構築したベクターの評価、配列を変更しながら解析する実験に適します。過剰発現系であるため、比較的高いシグナルが得られます。
安定発現	同じベクターを使う実験やスクリーニング、トランスフェクション効率が悪い細胞に適します。細胞あたりのベクターコピー数が少ないため、一般に一過性発現よりシグナルが低くなります。高発光の NanoLuc® はゲノムに1コピー挿入された場合でも検出できるため、安定発現株でのアッセイに最適です。
レポーターの数	一過性発現の場合は実験レポーターのほかに内部標準レポーターが必要です。また実験レポーターを2種類使うこともできます。レポーターを2種類使う場合は基質や発光メカニズムが異なる組合せを選び、デュアルアッセイ試薬でアッセイします。 → デュアルレポーターアッセイの有用性 (6 ページ)

### ベクターの選定とクローニング、クローン

レポーター	実験レポーターは発光値が高いものを選びましょう。一般に解析対象のプロモーターは活性が弱くシグナルは低めです。高発光なら NanoLuc®, 実績と種類の豊富さでホタルがお勧めです。
内部標準レポーター	実験レポーターと基質や発光メカニズムが異なるものを選びます。NanoLuc® にはホタルを、ホタルには NanoLuc® かウミシイタケを選択します。
分解促進配列	シグナルへの迅速な応答が必要な場合は分解促進配列付加タイプを選びます。NanoLuc® は NlucP、ホタルなら発光強度と応答性のバランスが取れた luc2P がお勧めです。

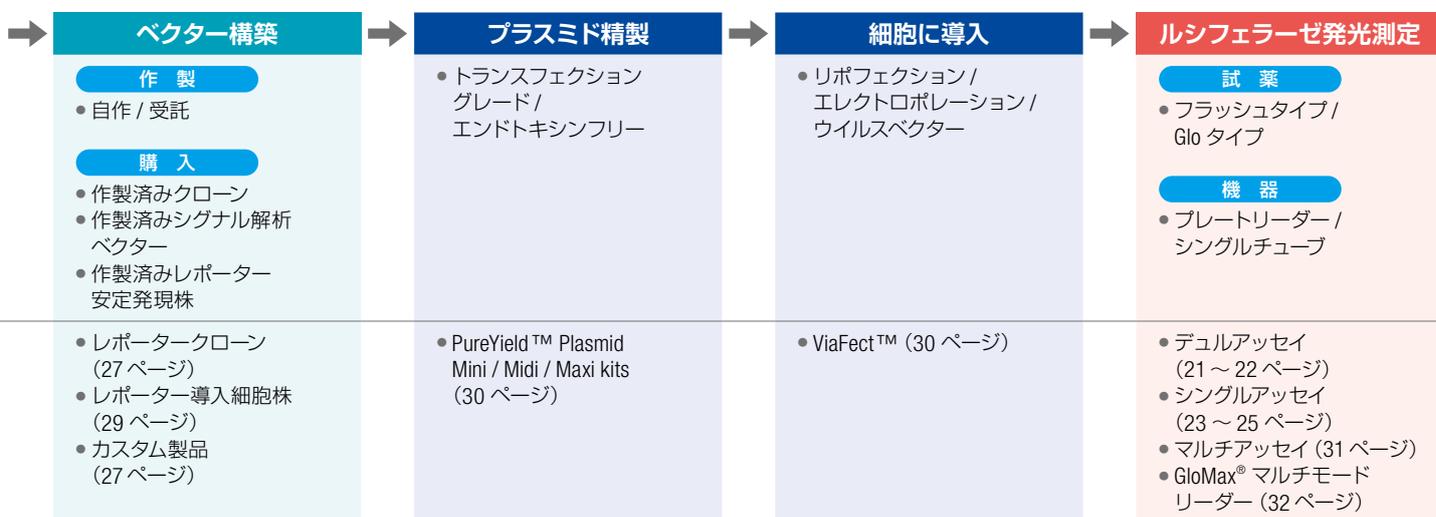
## 代表的なベクター組合せ

アプリケーション	実験レポーター	内部標準レポーター
全長プロモーター解析 (一過性発現)	<ul style="list-style-type: none"> <li>pGL4.10 [luc2]</li> <li>pNL1.1 [Nluc]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>pGL4.74 [hRluc/TK], pNL-TK, pNL-PGK</li> <li>pGL4.53 [luc2/Pgk], pGL4.54 [luc2/TK]</li> </ul>
シグナル解析 (一過性発現)	<ul style="list-style-type: none"> <li>pGL4.23 [luc2/minP]</li> <li>pNL3.2 [NlucP/minP]</li> </ul>	TK プロモーター : ウイルス由来 PGK プロモーター : ヒト由来、TK と同程度か少し弱い程度 (細胞種に依存)
シグナル解析 (安定発現)	<ul style="list-style-type: none"> <li>pGL4.27 [luc2P/minP/Hygro]</li> </ul>	-

ベクター挿入配列…標的遺伝子のプロモーター領域が不明の場合は、まず転写開始点から1 kb 程度上流まで (近位プロモーター) を選択します。5' UTR の解析ではレポーター開始コドンとの重複を避けるため、ATG 手前までを挿入します。シグナル応答配列の解析には最小プロモーター (minP) が必要です。シグナル応答配列とともにベクターに挿入するか、minP を持つベクターを使用します。

ベクター構築……ゲノムからのクローニング、人工遺伝子合成で得た配列をベクターに組み込みます。標的遺伝子の複製済みクローンやベクター、安定発現株が市販されていれば、実験を早く立ち上げることができます。

ベクター (26 ページ)、クローン (27 ページ)、安定発現株 (29 ページ) をご覧ください。



## プラスミド精製とトランスフェクションの重要性

一過性発現でレポーターアッセイを行う場合、トランスフェクション効率は非常に重要な要因です。最適な導入条件や安定発現株を得ることができれば、あとはデータを取るだけです。トランスフェクション効率に影響する要因はいくつかあります。

### プラスミド精製度

エンドトキシン、塩、エタノールの混入はトランスフェクション効率を著しく下げます。トランスフェクショングレードの精製キットを使用してください。プライマリー細胞など、エンドトキシン感受性の高い細胞にはエンドトキシンフリーレベルの精製グレードが必要です。

### トランスフェクション法

操作の簡便さからリポフェクションが広く使用されていますが、導入が難しい細胞にはエレクトロポレーションやウイルスベクターが使われています。

## ルシフェラーゼ発光測定

### 発光試薬

発光持続時間の違いでフラッシュタイプ、Gloタイプに分かれます。フラッシュタイプは数分～十数分でシグナルが最高値の半分になります。プレートリーダーで測定する場合はインジェクターが必要です。Gloタイプは30分～数時間シグナルが持続します。サンプル数が多い場合は持続時間が長い製品を使用します。プレート十数枚なら1～2時間程度で十分測定できます。

### 機器、測定容器

発光測定にはルミノメーター、または発光測定モードを持つマルチリーダーを使用します。蛍光リーダーは検出感度が低いため使用できません。プレートリーダーの場合は白色プレートを使用します。透明プレートでは隣接ウェルからの発光漏れにより正確な測定ができません。黒プレートではシグナルが約1/10に低下します。細胞培養と測定を同じプレートで行う場合は底面が透明のクリアボトムプレートを使用します。シングルチューブタイプの場合は機器に合ったチューブを使用します。

アッセイ / 検出試薬 選択ガイド

アッセイ数	アッセイの タイミング	アッセイ試薬	測定対象 (遺伝子)	感度	ホモジニアス****	発光持続時間 (測定可能時間)	インジェクション (試薬の注入回数)	ページ
デュアル	エンドポイント (細胞破壊)	Nano-Glo® Dual-Luciferase® Reporter Assay System	●●	✓✓✓✓	○	2時間 / 2時間	2	21
		Dual-Luciferase® Assay System	●●	✓✓✓	×	15分間 / 2分間	2	22
		Dual-Glo™ Assay System	●●	✓✓	○	2時間 / 2時間	2	22
シングル	リアルタイム / Live Cell イメージング (生細胞)	ONE-Glo™ Assay System	●	✓✓	○	1-5時間	1	24
		Steady-Glo® Assay System	●	✓✓	○	5時間	1	24
		Bright-Glo™ Assay System	●	✓✓✓	○	30分間	1	24
		Renilla-Glo™ Assay System	●	✓✓	○	1時間	1	24
		Nano-Glo® Assay System	●	✓✓✓✓	○	2時間	1*	23
		Nano-Glo® Live Cell Substrate and Vivazine™, Endurazine™ <b>NEW</b>	●	✓✓✓✓	○	(2時間 / >72時間 [V] / >24時間 [E])	0***	23
In Vivo イメージング (動物個体)	In Vivo イメージング (動物個体)	ViviRen™ and EnduRen™ Cell Substrate	●	(V) ✓✓✓ (E) ✓✓	○	(>2時間 [V] / >24時間 [E])	0***	25
		VivoGlo™ Luciferin, In Vivo Grade	●	✓✓	○	—	0****	25
		EnduRen™ In Vivo Renilla Luciferase Substrate	●	✓✓	○	—	0****	25
		ViviRen™ In Vivo Renilla Luciferase Substrate	●	✓✓✓	○	—	0****	25

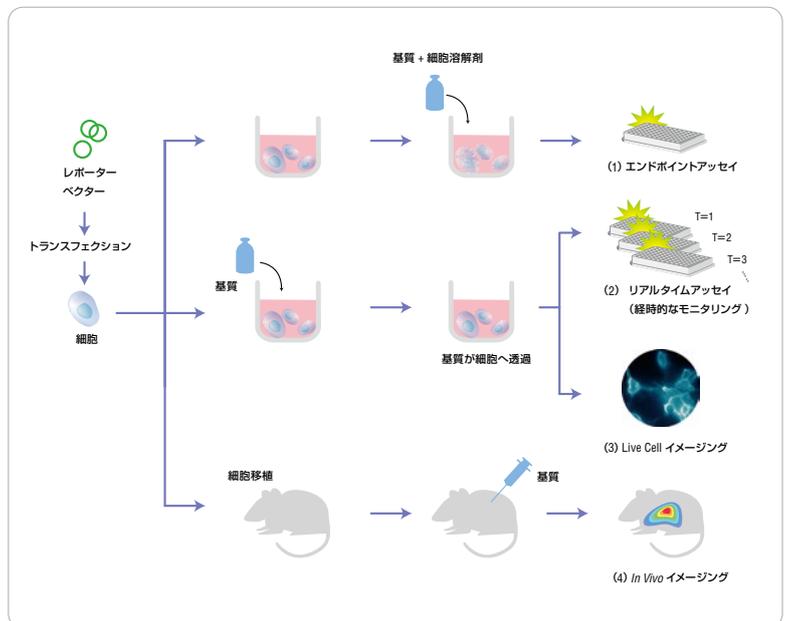
※ sec ベクター使用し、培地上澄を移してアッセイ。  
 ※※ 基質のみを細胞に加えればリアルタイムアッセイ / Live Cell イメージングが可能。  
 ※※※ 試薬は予め培地に溶解。  
 ※※※※ 培地の除去、細胞の洗浄、細胞の溶解操作が不要で、培地を含む細胞に試薬を加えるだけの定量方法。

● NanoLuc® ルシフェラーゼ ● ホタルルシフェラーゼ ● ウミシイタケルシフェラーゼ

ルシフェラーゼレポーターの測定またはイメージング

ルシフェラーゼ活性の検出方法には4つのタイプがあります。

- 一般的なエンドポイントアッセイでは、細胞を溶解して内部のルシフェラーゼと基質が反応。
- リアルタイムアッセイでは、予め培地に加えられた基質が細胞内に透過し、細胞内でルシフェラーゼ発光反応が起る。細胞を破壊しないため、同じサンプルプレートを経時的に測定することで、ルシフェラーゼ発光をモニタリングすることができる。また他の細胞内マーカーアッセイシステムと組み合わせたマルチアッセイも可能。
- Live Cell イメージングも同様に基質が細胞内に透過し、細胞内でルシフェラーゼ発光反応が起る。これをLV200などの発光イメージングシステムで撮影する。
- In Vivo イメージングでは、ルシフェラーゼ遺伝子を導入した細胞をマウスなどの動物個体に移植することで、がん細胞の転移や薬物の影響などを経時的に観察することができる。



## デュアルアッセイ (高感度タイプ) (エンドポイント)

### Nano-Glo® Dual-Luciferase® Reporter Assay System



Nano-Glo® Dual-Luciferase® Reporter Assay System は最も高感度なデュアル・レポーターアッセイで、細胞内の微細な変化も検出することができます。1 サンプルからホタルおよび NanoLuc® ルシフェラーゼ活性を連続測定することができます。新たなルシフェラーゼの組み合わせに最適化された新しい反応ケミストリによりデュアル・レポーターがより強力なツールとして生まれ変わります。

Nano-Glo® Dual-Luciferase® Reporter Assay System は 96/384/1536 ウェルフォーマットでのハイスループットフォーマットに対応するようにデザインされており、2 種類の試薬を順次加えるだけです。どちらの発光シグナルも半減期約 2 時間です。最初にホタルルシフェラーゼ用の試薬を培地中の細胞に直接加えます (細胞の洗浄や溶解操作は不要)。次に NanoDLR™ Stop & Glo® Reagent を加えることによりホタルルシフェラーゼのシグナルを 1,000,000 分の 1 以下にまで減衰させると同時に NanoLuc® ルシフェラーゼの基質を供給します。

#### ● 低い発現レベルでも高感度にアッセイ

生体機能への影響を最小限に抑えながらより微細な変化をとらえることができます。最新型デュアルレポーターアッセイで最良のシグナル/バックグラウンド比がえられます。

#### ● より柔軟なアッセイデザインが可能

ホタルまたは NanoLuc® ルシフェラーゼのどちらも実験レポーターとして使用可能です。ホモジニアスアッセイでもライセートを用いたアッセイでも選べます。

#### ● 試薬の安定性が向上

室温や 4℃での保存\*も可能になり、ばらつきが抑制され、繰り返しの使用が簡便になります。また ONE-Glo™ EX も別売され、同じホタルアッセイ試薬をシングル、デュアルの両フォーマットで利用可能になりました。

\*ONE-Glo™ EX Reagent : 室温 (22℃) 保存 約 18 時間、4℃保存約 3.5 日 (10%活性低下)、NanoDLR™ Stop & Glo® Reagent: 室温保存 約 32 時間、4℃保存 約 3.5 日 (10%活性低下)

#### ● コントロール DNA 量を抑え、より信頼性の高いデータ

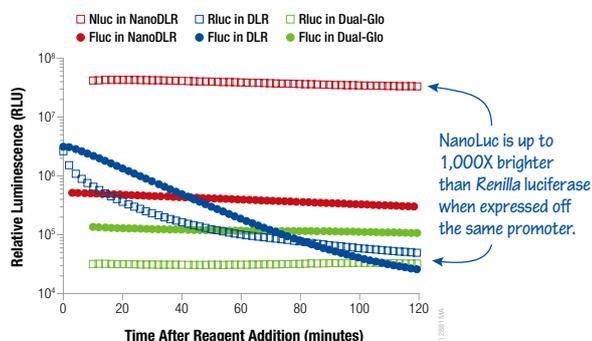
発光量の高いレポーターならばコントロール DNA の使用量を低くおさえることにより、アーティファクトを最小限に抑えることができます。

#### ● アッセイパフォーマンスの向上

ホタルルシフェラーゼのクエンチング効率向上により、2 つのレポーターのダイナミクスが広がり、より安定なデータが得られるようになります。



各種ルシフェラーゼアッセイとの発光比較



#### NanoDLR™ アッセイのより明るく安定な発光特性

NanoDLR™ アッセイのより明るく安定な発光特性 TK-Rluc (ウミシイタク): TK-Flu (c ホタル): キャリア DNA または TK-Nluc (NanoLuc®): TK-Fluc: キャリア DNA をそれぞれ 1:1:8 の割合で HEK293 細胞にトランスフェクションし、NanoDLR™、DLR™ または Dual-Glo® Dual-Luciferase Assay System を用いて測定した。同じプロモーターでルシフェラーゼを発現させた場合、NanoDLR™ Assay により測定した Nluc レポーターで最も明るい長時間発光シグナルが得られ、Fluc レポーターも十分明るい長時間発光シグナルが得られた。

製品名	サイズ	カタログ番号
Nano-Glo® Dual-Luciferase® Reporter Assay System	10 ml	N1610
	100 ml	N1620
	10 × 10 ml	N1630
ONE-Glo™ EX Luciferase Assay System	10 × 100 ml	N1650
	10 ml	E8110
	100 ml	E8120
	10 × 10 ml	E8130
	10 × 100 ml	E8150

10 ml は 96 ウェルプレート 100 ~ 120 ウェル分に十分な試薬が含まれます。ベクターについては 26-28 ページをご覧ください。

#### 【製品購入における注意点】

Nano-Glo® Dual-Luciferase® Reporter Assay System の使用は非営利組織 (大学、公的研究機関など)、営利組織にかかわらず、ライセンスプログラムの内容をご確認いただく必要があります。ライセンスプログラムに関しては [www.promega.co.jp/license/](http://www.promega.co.jp/license/) をご覧ください。

## デュアルアッセイ (エンドポイント)

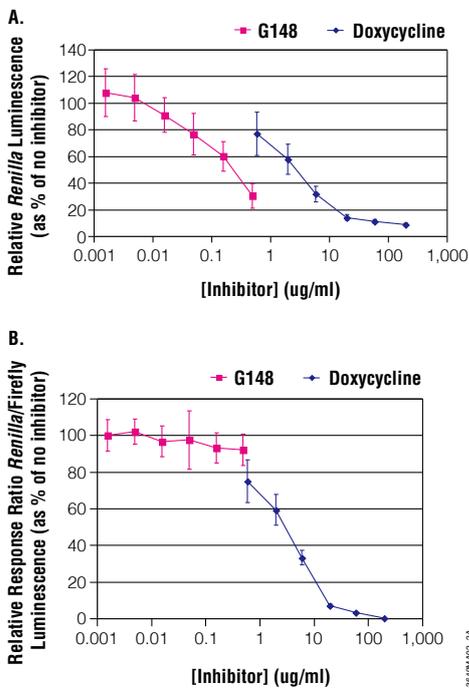
## Dual-Glo™ Luciferase Assay System

## Dual-Luciferase® Reporter Assay System



デュアルアッセイにより、実験用レポーターのデータをコントロールレポーターのデータで補正し、実験間のバラツキを低減することができます。

Dual-Glo™ Luciferase Assay System および Dual-Luciferase® Reporter Assay System はホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を導入した哺乳動物細胞から得られる2種類のルシフェラーゼ活性を、発光シグナルとして連続定量するための試薬です。Dual-Glo™ はシンプルなホモジニアスアッセイ方式(添加→測光)を採用しており、培地の除去、細胞洗浄を行わずに試薬を加えるだけなので特に96、384プレートを用いた多検体のアッセイに最適です。Dual-Luciferase® は細胞ライセートを調製する必要がありますが、Dual-Glo™ に比べ高い発光レベルを特長としています(各システムの発光値、発光半減期については20ページ参照)。



**デュアル・ルシフェラーゼレポーターは  
特異的および非特異的な細胞内反応を識別する**

Tet-Off プロモーターで制御されるウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子および CMV プロモーターで制御されるホタルルシフェラーゼ遺伝子 (pCI Vector+luc+) を、CHO 細胞に一過性にトランスフェクションし、様々な濃度の特異的阻害剤ドキシサイクリン(テトラサイクリン誘導体)および全般的阻害剤 G418 に暴露した。

**パネル A (シングルレポーター) :** 実験用レポーターとしてのウミシイタケルシフェラーゼのみの値(阻害剤無添加の際の値を差し引いた)。その結果、ウミシイタケルシフェラーゼ発光は、2つの阻害剤により減少した。

**パネル B (デュアルレポーター) :** 実験用レポーターとしてのウミシイタケルシフェラーゼの値を、コントロールとしてのホタルルシフェラーゼ発光値で補正した。この結果、デュアル・レポーターを用いることにより、特異的、非特異的細胞内反応を識別できることが示された。

製品名	サイズ	カタログ番号
Dual-Glo™ Luciferase Assay System	10 ml	E2920
	100 ml	E2940
	10 × 100 ml	E2980

10 ml は 96 ウェルプレートで約 130 ウェル分に相当。  
ベクター、組換え細胞については 26, 29 ページをご覧ください。

製品名	サイズ	カタログ番号
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	100 回分	E1910
Dual-Luciferase® Reporter Assay System 10-Pack	1000 回分	E1960
Dual-Luciferase® Reporter 1000 Assay System	1000 回分	E1980

サイズは 96 ウェルプレートに換算した回数。  
ベクター、組換え細胞については 26, 29 ページをご覧ください。

## シングルアッセイ〈エンドポイント&amp;リアルタイム[分泌アッセイ]〉

Nano-Glo<sup>®</sup> Luciferase Assay System

Nano-Glo<sup>®</sup> Luciferase Assay Reagent は NanoLuc<sup>®</sup> Luciferase の検出用のアッセイシステムです。Nano-Glo<sup>®</sup> Luciferase Assay System は 1 種類の試薬を加えるだけのシンプルな操作性を提供するホモジニアスフォーマットを採用しており、培地の除去や細胞の洗浄は不要です。一般的な培地で使用した場合、半減期約 2 時間におよぶグロータイプの発光シグナルが得られます。試薬は Nano-Glo<sup>®</sup> Luciferase Assay Substrate と Nano-Glo<sup>®</sup> Luciferase Assay Buffer を混和するだけで調製できます。試薬には溶解バッファーが含まれており、NanoLuc<sup>®</sup> luciferase を発現する細胞あるいはルシフェラーゼが分泌された培地に直接使用することができます (IL6 分泌シグナルを含む“secNuc”ベクターを用いた場合)。

## ● ハイエンドなレポーターシステム

発光量の高い NanoLuc<sup>®</sup> レポーターはより感度が求められる難しい実験用途に使用可能。

## ● 最適化が容易

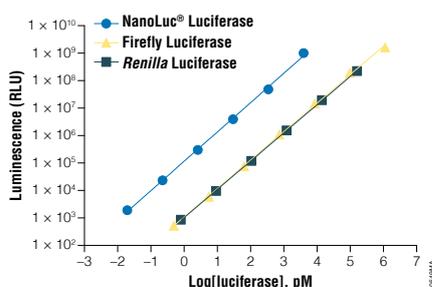
添加して測定するだけのシンプルな操作性により HTS への変更が容易。

## ● より明るく長い発光時間

バッチ操作あるいは連続操作に最適化。

## ● 自己発光の低減

低いバックグラウンドを実現する試薬組成により感度が向上。



NanoLuc<sup>®</sup>、ホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼアッセイの感度の比較

製品名	サイズ	カタログ番号
Nano-Glo <sup>®</sup> Luciferase Assay System	10 ml	N1110
	100 ml	N1120
	10 × 10 ml	N1130
	10 × 100 ml	N1150

10 ml は 96 ウェルプレート 100 ウェル分に十分な試薬が含まれます。ベクターについては 27, 28 ページをご覧ください。

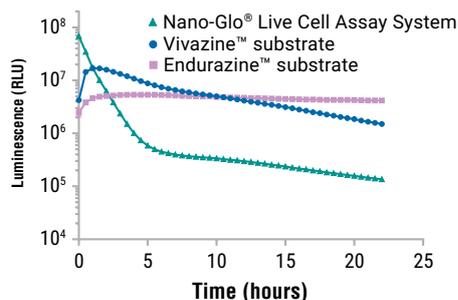
## 【製品購入における注意点】

Nano-Glo<sup>®</sup> Luciferase Assay System の使用は非営利組織 (大学、公的研究機関など)、営利組織にかかわらず、ライセンスプログラムの内容をご確認いただく必要があります。ライセンスプログラムに関しては [www.promega.co.jp/license/](http://www.promega.co.jp/license/) をご覧ください。

## Live Cell イメージング

Nano-Glo<sup>®</sup> Live Cell Assay, Endurazine<sup>™</sup>, Vivazine<sup>™</sup>

Nano-Glo<sup>®</sup> Live Cell Assay System は生細胞のまま発光を測定する 1 液添加方式の非細胞溶解性の試薬です。NanoLuc<sup>®</sup> および NanoBIT<sup>®</sup> の検出の他、NanoBRET<sup>™</sup> や NanoLuc<sup>®</sup> 融合タンパク質の生細胞イメージングにも使用できます。Nano-Glo<sup>®</sup> Live Cell Substrate は付属の Dilution Buffer で希釈して Nano-Glo<sup>®</sup> Live Cell Reagent を調製し、培地中に直接添加することで、細胞生存性を損なわずに最長 2 時間まで連続した発光モニタリングが行えます。Endurazine<sup>™</sup>、Vivazine<sup>™</sup> は数時間から数日にわたる長時間発光モニタリングが可能であり、内在レベルのタンパク質測定も可能な感度を有します。



Nano-Glo<sup>®</sup> Live Cell Assay System、Endurazine<sup>™</sup>、Vivazine<sup>™</sup> の発光カインेटクス比較

製品名	サイズ	カタログ番号
Nano-Glo <sup>®</sup> Live Cell Assay System	100 回分	N2011
	1,000 回分	N2012
	10,00 回分	N2013
Nano-Glo <sup>®</sup> Vivazine <sup>™</sup> Substrate	0.1 ml	N2580
	1 ml	N2581
	10 ml	N2582
Nano-Glo <sup>®</sup> Endurazine <sup>™</sup> Substrate	0.1 ml	N2570
	1 ml	N2571
	10 ml	N2572
Nano-Glo <sup>®</sup> Extended Live Cell Substrate Trial Pack (Endurazine <sup>™</sup> および Vivazine <sup>™</sup> 各 0.1 ml)	0.2 ml	N2590

## 【製品購入における注意点】

Nano-Glo<sup>®</sup> Live Cell の使用は非営利組織 (大学、公的研究機関など)、営利組織にかかわらず、ライセンスプログラムの内容をご確認いただく必要があります。ライセンスプログラムに関しては [www.promega.co.jp/license/](http://www.promega.co.jp/license/) をご覧ください。

シングルアッセイ 〈エンドポイント〉



ONE-Glo™/ Bright-Glo™/ Steady-Glo® Luciferase Assay Systems

ONE-Glo™ Luciferase Assay System は、より高感度、頑健に哺乳動物細胞で発現したルシフェラーゼを測定するためのホモジニアスアッセイシステムで、ハイスループット、ウルトラハイスループットアプリケーションに最適です。ONE-Glo™ Assay には新しく開発されたルシフェラーゼの基質が含まれているため、試薬の安定性、サンプルに含まれる成分に対する寛容性が向上しました。また、標準的なルシフェラーゼアッセイ試薬よりも硫黄臭が低減され、使いやすくなっています。これらの特長により、他のレポーターアッセイを多検体で行う際の不便さを低減することができ、発光パフォーマンスが確実に発揮されます。シングル-エンドポイントアッセイで最も使いやすいシステムです。

Bright-Glo™ Reagent、Steady-Glo® Reagent は従来型のグロータイプのシングルルシフェラーゼアッセイシステムで、それぞれ発光強度 (Bright-Glo™ Reagent は Steady-Glo® Reagent の約 7 ~ 8 倍)、発光時間が異なります。

製品名	サイズ	カタログ番号
ONE-Glo™ Luciferase Assay System	10 ml	E6110
	100 ml	E6120
	1 L	E6130

10 ml は 96 ウェルプレートで約 100 ウェル分に相当。  
ベクター、組換え細胞については 26, 29 ページをご覧ください。

製品名	サイズ	カタログ番号
Bright-Glo™ Luciferase Assay System	10 ml	E2610
	100 ml	E2620
	10 × 100 ml	E2650

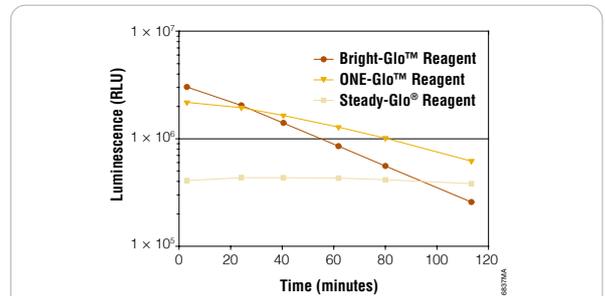
10 ml は 96 ウェルプレートで約 100 ウェル分に相当。  
ベクター、組換え細胞については 26, 29 ページをご覧ください。

製品名	サイズ	カタログ番号
Steady-Glo® Luciferase Assay System	10 ml	E2510
	100 ml	E2520
	10 × 100 ml	E2550

10 ml は 96 ウェルプレートで約 100 ウェル分に相当。  
ベクター、組換え細胞については 26, 29 ページをご覧ください。

ONE-Glo™ Luciferase Assay System

- **よりシンプルな最適化**  
頑健なパフォーマンス、硫黄臭の低減、保存条件の改善、大容量サイズの設定などにより最適化が容易で効率的に行えるようになりました。
- **室温または 4℃ 保存も可能**  
室温または 4℃ での安定性増加により、日々の使用にも簡便な保存が可能になりました。
- **定量精度の増加**  
ONE-Glo™ Reagent は混和や分注の条件に対して寛容であるため、再現性が向上 (384, 1536 ウェルプレートに最適)。
- **より明るく長いシグナル**  
バッチおよび連続プロセスに最適化されており、長時間の高レベル発光は特に検出前に長時間のインキュベーションを要する場合に有用です。
- **サンプルに含有する成分による影響を低減**  
ONE-Glo™ Assay の新しいケミストリーは他のルシフェラーゼアッセイよりも培地、フェノールレッド、ルシフェラーゼ阻害剤に寛容。



長時間発光タイプのルシフェラーゼ試薬の発光比較  
96 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 50 μl 分注した精製ルシフェラーゼを含むサンプルに各ルシフェラーゼアッセイ試薬 50 μl (14.9 ng/ml with 0.1% Prionex®) を加えた。

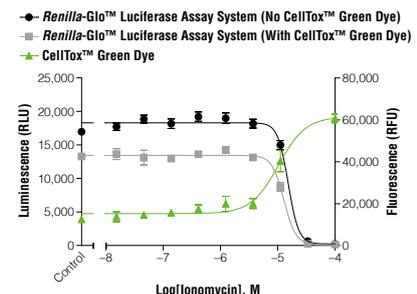
Renilla-Glo™ Luciferase Assay System



Renilla-Glo™ Luciferase Assay System は、1 種類の試薬を加えるだけでグロータイプのウミシイタケルシフェラーゼシグナルを測定することができます。基質を再溶解した試薬をサンプルに加えると安定なシグナルを得ることができます (例: 22℃, 60 分以上の半減期)。また、この試薬には細胞を溶解する作用もあり、セレンテラジン基質の自家発光も抑えられています。

製品名	サイズ	カタログ番号
Renilla-Glo™ Luciferase Assay System	10 ml	E2710
	100 ml	E2720
	10 × 100 ml	E2750

10 ml は 96 ウェルプレートで約 100 ウェル分に相当。  
ベクターについては 26, 27 ページをご覧ください。



Renilla-Glo™ と CellTox™ Green とのマルチアッセイ

シングルアッセイ (リアルタイム) & *In Vivo* イメージング

## EnduRen™/ViviRen™/VivoGlo™ Substrate



Fire Fly



Renilla

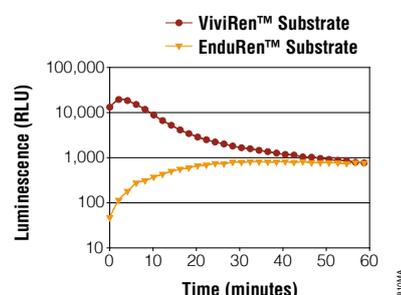
EnduRen™ Live Cell Substrates は、生細胞を用いてウミシヤケルシフェラーゼ活性を経時的 (>24 時間) に測定するための試薬です。

この EnduRen™ 基質は、酸化を受けるサイトがブロックされているため、基質の分解および自家発光を最低限に抑えけるとともに、野生型のセレンテラジンに較べ、最大 10 倍のシグナル/バックグラウンド比を示します。従来のセレンテラジンに比べ、自動化への適応性、より高い感度、BRET のアプリケーションを与えます。

EnduRen™ 基質は標準的な培地に溶かすだけで、ほとんどの哺乳動物細胞種で基質が細胞内に透過します。そのため、細胞培養後にアッセイ試薬を新たに添加するステップが無い場合、アッセイをより単純化できます。EnduRen™ 基質が細胞内に透過すると、細胞内のエステラーゼにより保護基が外れ、セレンテラジン h になります。これがウミシヤケルシフェラーゼの基質となり発光が開始されます。

製品名	サイズ	カタログ番号
EnduRen™ Live Cell [ <i>In Vivo</i> ] Substrate	1 プレート分 (0.34 mg)	E6481 [P1111]
	10 プレート分 (3.4 mg)	E6482 [P1112]

製品名	サイズ	カタログ番号
VivoGlo™ Luciferin, <i>In Vivo</i> Grade	50 mg	P1041



ViviRen™ Live Cell Substrate は野生型セレンテラジンよりも 3 ~ 5 倍の発光レベルを示します。さらに、自家発光が極めて低く抑えられているため、セレンテラジンに比べて最大 100 倍のシグナル/ノイズ比を実現できます。

製品名	サイズ	カタログ番号
ViviRen™ Live Cell [ <i>In Vivo</i> ] Substrate	1 プレート分 (0.37 mg)	E6491 [P1231]
	10 プレート分 (3.7 mg)	E6492 [P1232]

【*In Vivo* 用基質 (カタログ番号 P1111, P1112, P1231, P1232, P1041) における注意点】各種ベクターの使用は非営利組織 (大学、公的研究機関など)、営利組織にかかわらず、ライセンスプログラムの内容をご確認いただく必要があります。ライセンスプログラムに関しては [www.promega.co.jp/license/](http://www.promega.co.jp/license/) をご覧ください。

## NanoBRET™ 関連試薬

## NanoBRET™ Nano-Glo® Detection System



HaloTag®



NanoLuc®

NanoBRET™ Nano-Glo® Detection System は NanoBRET™ アッセイ用試薬であり、NanoLuc® 基質である Nano-Glo® Luciferase Assay Substrate と、HaloTag® 蛍光リガンドである HaloTag® NanoBRET™ 618 Ligand のセットです。明るく低波長側にシフトした NanoLuc® ドナーと、近赤外側にシフトした HaloTag® アクセプターにより最適なスペクトルオーバーラップを実現し、従来の BRET に比べシグナルが増加し高い定量性を示します。HaloTag® は 33 kDa のタグタンパク質で、特異的に HaloTag® リガンドと共有結合するため様々なタンパク質機能解析に利用することができます。

製品名	サイズ	カタログ番号
NanoBRET™ Nano-Glo® Detection System	200 回分	N1661
	1,000 回分	N1662

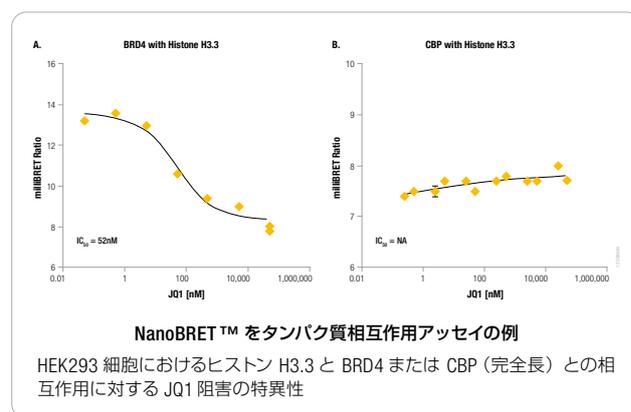
## 【製品購入における注意点】

NanoBRET™ Nano-Glo® Detection System の使用は非営利組織 (大学、公的研究機関など)、営利組織にかかわらず、ライセンスプログラムの内容をご確認いただく必要があります。ライセンスプログラムに関しては [www.promega.co.jp/license/](http://www.promega.co.jp/license/) をご覧ください。

## Pre-Designed NanoBRET™ PPI Assays

プロメガでは主要なタンパク質間相互作用の組み合わせとして、ヒストン-プロモドメイン、HDAC、p53、Myc、EGFR、Kras、RNA 結合タンパク質等の最適化済みベクターセットおよび試薬の製品 Pre-Designed NanoBRET™ PPI Assays をご用意しています。

※ NanoBRET™ PPI Assay へのお問い合わせ、見積もり請求については弊社テクニカルサービス部までお寄せください。



## NanoBRET™ をタンパク質相互作用アッセイの例

HEK293 細胞におけるヒストン H3.3 と BRD4 または CBP (完全長) との相互作用に対する JQ1 阻害の特異性

## Pre-Designed NanoBRET™ PPI Assays ラインナップ

- プロモドメイン (例: BRD2 Histone, H3.3)
- その他のエピジェネティクス (例: HDAC1, HDAC2)
- 転写 (例: P53, MDM2)
- シグナル伝達 / キナーゼ (例: GRB2, EGFR)
- 膜タンパク質 (例: EGFR, EGFR)
- RNA 結合タンパク質 (例: hnRNP A, hnRNP F)

レポーターベクター

製品名	マルチクローニングサイト	レポーター遺伝子用プロモーター / 応答配列	レポーター遺伝子	分解 / 分泌配列	動物細胞選択マーカー	カタログ番号	
<b>NanoLuc® ルシフェラーゼ</b>							
シグナル解析用ベクター	pNL[NlucP/NFAT-RE/Hygro] Vector (特注)	No	<b>NFAT-RE</b>	Nluc	hPEST	Hygro CS177604	
	pNL[NlucP/CRE/Hygro] Vector (特注)	No	<b>CRE</b>	Nluc	hPEST	Hygro CS186804	
	pNL[NlucP/p53-RE/Hygro] Vector (特注)	No	<b>p53-RE</b>	Nluc	hPEST	Hygro CS194102	
	pNL[NlucP/ATF6-RE/Hygro] Vector (特注)	No	<b>ATF6-RE</b>	Nluc	hPEST	Hygro CS186805	
	pNL[NlucP/ATF4-RE/Hygro] Vector (特注)	No	<b>ATF4-RE</b>	Nluc	hPEST	Hygro CS183701	
	pNL[NlucP/MRE/Hygro] Vector (特注)	No	<b>MRE</b>	Nluc	hPEST	Hygro CS194106	
	pNL[NlucP/HRE/Hygro] Vector (特注)	No	<b>HRE</b>	Nluc	hPEST	Hygro CS180901	
	pNL[NlucP/GAS-RE/Hygro] Vector (特注)	No	<b>GAS-RE</b>	Nluc	hPEST	Hygro CS191901	
	pNL[NlucP/ISRE/Hygro] Vector (特注)	No	<b>ISRE</b>	Nluc	hPEST	Hygro CS190901	
	pNL[NlucP/SIE/Hygro] Vector (特注)	No	<b>SIE</b>	Nluc	hPEST	Hygro CS189701	
	pNL[NlucP/STAT5-RE/Hygro] Vector (特注)	No	<b>STAT5-RE</b>	Nluc	hPEST	Hygro CS180903	
	pNL[NlucP/AP1-RE/Hygro] Vector (特注)	No	<b>AP1-RE</b>	Nluc	hPEST	Hygro CS177603	
	pNL[NlucP/CEBP-RE/Hygro] Vector (特注)	No	<b>CEBP-RE</b>	Nluc	hPEST	Hygro CS188003	
	pNL[NlucP/MycMax-RE/Hygro] Vector (特注)	No	<b>MycMax-RE</b>	Nluc	hPEST	Hygro CS175201	
	pNL[NlucP/ARE/Hygro] Vector (特注)	No	<b>ARE</b>	Nluc	hPEST	Hygro CS180902	
	pNL[NlucP/SRE/Hygro] Vector (特注)	No	<b>SRE</b>	Nluc	hPEST	Hygro CS177601	
	pNL[NlucP/SRF/Hygro] Vector (特注)	No	<b>SRF</b>	Nluc	hPEST	Hygro CS194101	
	pNL[NlucP/SBE/Hygro] Vector (特注)	No	<b>SBE</b>	Nluc	hPEST	Hygro CS177101	
	pNL[NlucP/TCF/LEF-RE/Hygro] Vector (特注)	No	<b>TCF-LEF-RE</b>	Nluc	hPEST	Hygro CS181801	
	pNL[NlucP/XRE/Hygro] Vector (特注)	No	<b>XRE</b>	Nluc	hPEST	Hygro CS186808	
pNL3.2.NF-κB-RE [NlucP/NF-κB-RE/Hygro]Vector	No	<b>NF-κB-RE</b>	Nluc	hPEST	Hygro N1111		
クローニングベクター	pNL3.1[Nluc/minP]Vector	Yes	<b>minP</b>	Nluc	No	No N1031	
	pNL3.2[Nluc/minP]Vector	Yes	<b>minP</b>	Nluc	hPEST	No N1041	
	pNL3.3[secNluc/minP]Vector	Yes	<b>minP</b>	Nluc	<b>IL-6</b>	No N1051	
	pNLCol2[luc2-P2A-NlucP/minP/Hygro]Vector	Yes	<b>minP</b>	Nluc/2A/luc2	hPEST	Hygro N1471	
	pNL1.1[Nluc]Vector	Yes	No	Nluc	No	No N1001	
	pNL1.2[NlucP]Vector	Yes	No	Nluc	hPEST	No N1011	
	pNL1.3[secNluc]Vector	Yes	No	Nluc	<b>IL-6</b>	No N1021	
	pNL2.1[Nluc/Hygro]Vector	Yes	No	Nluc	No	Hygro N1061	
	pNL2.2[NlucP/Hygro]Vector	Yes	No	Nluc	hPEST	Hygro N1071	
	pNL2.3[secNluc/Hygro]Vector	Yes	No	Nluc	<b>IL-6</b>	Hygro N1081	
pNLCol1[luc2-P2A-NlucP/Hygro] Vector	Yes	No	Nluc/2A/luc2	hPEST	Hygro N1461		
コントロールベクター	pNL1.1.PGK[Nluc/PGK]Vector	No	<b>PGK</b>	Nluc	No	No N1441	
	pNLCol4[luc2-P2A-NlucP/PGK/Hygro]Vector	No	<b>PGK</b>	Nluc/2A/luc2	hPEST	Hygro N1491	
	pNL1.1.TK[Nluc/TK]Vector	No	<b>TK</b>	Nluc	No	No N1501	
	pNL1.1.CMV[Nluc/CMV]Vector	No	<b>CMV</b>	Nluc	No	No N1091	
	pNL1.3.CMV[secNluc/CMV]Vector	No	<b>CMV</b>	Nluc	<b>IL-6</b>	No N1101	
	pNL3.2.CMV[NlucP/CMV]Vector	No	<b>CMV</b>	Nluc	hPEST	Hygro N1411	
pNLCol3[luc2-P2A-NlucP/CMV/Hygro]Vector	No	<b>CMV</b>	Nluc/2A/luc2	hPEST	Hygro N1481		
<b>ウミシイタケルシフェラーゼ</b>							
ベクター	クロールベクター	pGL4.70[hRluc]Vector	Yes	No	<i>hRluc</i>	No	No E6881
		pGL4.73[hRluc/SV40]Vector	No	<b>SV40</b>	<i>hRluc</i>	No	No E6911
		pGL4.74[hRluc/TK]Vector	No	<b>HSV-TK</b>	<i>hRluc</i>	No	No E6921
		pGL4.75[hRluc/CMV]Vector	No	<b>CMV</b>	<i>hRluc</i>	No	No E6931

特注：特別注文品のため専用の注文用紙が必要です。promega.formstack.com/forms/casorder よりお申込みください。



製品名	マルチ クローニング サイト	レポーター遺伝子用 プロモーター/ 応答配列	レポーター 遺伝子	分解/ 分泌配列	動物細胞 選択マーカー	カタログ 番号	
<b>ホタルルシフェラーゼ</b>							
シグナル解析用ベクター	pGL4.29[luc2P/CRE/Hygro]Vector	No	<b>CRE</b>	<i>luc2</i>	hPEST	Hygro	E8471
	pGL4.30[luc2P/NFAT-RE/Hygro]Vector	No	<b>NFAT-RE</b>	<i>luc2</i>	hPEST	Hygro	E8481
	pGL4.31[luc2P/Gal4 UAS/Hygro]Vector	No	<b>GAL4 UAS</b>	<i>luc2</i>	hPEST	Hygro	C9351
	pGL4.32[luc2P/NF-κB-RE/Hygro]Vector	No	<b>NF-KB-RE</b>	<i>luc2</i>	hPEST	Hygro	E8491
	pGL4.33[luc2P/SRE/Hygro]Vector	No	<b>SRE</b>	<i>luc2</i>	hPEST	Hygro	E1340
	pGL4.34[luc2P/SRF-RE/Hygro]Vector	No	<b>SRF-RE</b>	<i>luc2</i>	hPEST	Hygro	E1350
	pGL4.35[luc2P/9XGal4 UAS/Hygro]Vector	No	<b>9XGAL4 UAS</b>	<i>luc2</i>	hPEST	Hygro	E1370
	pGL4.36[luc2P/MMTV/Hygro]Vector	No	<b>MMTV</b>	<i>luc2</i>	hPEST	Hygro	E1360
	pGL4.37[luc2P/ARE/Hygro]Vector	No	<b>ARE</b>	<i>luc2</i>	hPEST	Hygro	E3641
	pGL4.38[luc2P/p53 RE/Hygro]Vector	No	<b>p53 RE</b>	<i>luc2</i>	hPEST	Hygro	E3651
	pGL4.39[luc2P/ATF6 RE/Hygro]Vector	No	<b>ATF6 RE</b>	<i>luc2</i>	hPEST	Hygro	E3661
	pGL4.40[luc2P/MRE/Hygro]Vector	No	<b>MRE</b>	<i>luc2</i>	hPEST	Hygro	E4131
	pGL4.41[luc2P/HSE/Hygro]Vector	No	<b>HSE</b>	<i>luc2</i>	hPEST	Hygro	E3751
	pGL4.42[luc2P/HRE/Hygro]Vector	No	<b>HRE</b>	<i>luc2</i>	hPEST	Hygro	E4001
	pGL4.43[luc2P/XRE/Hygro]Vector	No	<b>XRE</b>	<i>luc2</i>	hPEST	Hygro	E4121
	pGL4.44[luc2P/AP1 RE/Hygro]Vector	No	<b>AP1 RE</b>	<i>luc2</i>	hPEST	Hygro	E4111
	pGL4.45[luc2P/ISRE/Hygro]Vector	No	<b>ISRE</b>	<i>luc2</i>	hPEST	Hygro	E4141
	pGL4.47[luc2P/SIE/Hygro]Vector	No	<b>SIE</b>	<i>luc2</i>	hPEST	Hygro	E4041
	pGL4.48[luc2P/SBE/Hygro]Vector	No	<b>SBE</b>	<i>luc2</i>	hPEST	Hygro	E3671
	pGL4.49[luc2P/TCF-LEF RE/Hygro]Vector	No	<b>TCF-LEF RE</b>	<i>luc2</i>	hPEST	Hygro	E4611
pGL4.52[luc2P/STAT5 RE/Hygro]Vector	No	<b>STAT5 RE</b>	<i>luc2</i>	hPEST	Hygro	E4651	
クローニングベクター	pGL4.10[luc2]Vector	Yes	No	<i>luc2</i>	No	No	E6651
	pGL4.11[luc2P]Vector	Yes	No	<i>luc2</i>	hPEST	No	E6661
	pGL4.12[luc2CP]Vector	Yes	No	<i>luc2</i>	hCL1-hPEST	No	E6671
	pGL4.14[luc2/Hygro]Vector	Yes	No	<i>luc2</i>	No	Hygro	E6691
	pGL4.15[luc2P/Hygro]Vector	Yes	No	<i>luc2</i>	hPEST	Hygro	E6701
	pGL4.16[luc2CP/Hygro]Vector	Yes	No	<i>luc2</i>	hCL1-hPEST	Hygro	E6711
	pGL4.17[luc2/Neo]	Yes	No	<i>luc2</i>	No	Neo	E6721
	pGL4.18[luc2P/Neo]	Yes	No	<i>luc2</i>	hPEST	Neo	E6731
	pGL4.19[luc2CP/Neo]	Yes	No	<i>luc2</i>	hCL1-hPEST	Neo	E6741
	pGL4.20[luc2/Puro]	Yes	No	<i>luc2</i>	No	Puro	E6751
	pGL4.21[luc2P/Puro]	Yes	No	<i>luc2</i>	hPEST	Puro	E6761
	pGL4.22[luc2CP/Puro]	Yes	No	<i>luc2</i>	hCL1-hPEST	Puro	E6771
	pGL4.23[luc2/minP]Vector	Yes	<b>minP</b>	<i>luc2</i>	No	No	E8411
	pGL4.24[luc2P/minP]Vector	Yes	<b>minP</b>	<i>luc2</i>	hPEST	No	E8421
	pGL4.25[luc2CP/minP]Vector	Yes	<b>minP</b>	<i>luc2</i>	hCL1-hPEST	No	E8431
pGL4.26[luc2/minP/Hygro]Vector	Yes	<b>minP</b>	<i>luc2</i>	No	Hygro	E8441	
pGL4.27[luc2P/minP/Hygro]Vector	Yes	<b>minP</b>	<i>luc2</i>	hPEST	Hygro	E8451	
pGL4.28[luc2CP/minP/Hygro]Vector	Yes	<b>minP</b>	<i>luc2</i>	hCL1-hPEST	Hygro	E8461	
コントロールベクター	pGL4.13[luc2/SV40]Vector	No	<b>SV40</b>	<i>luc2</i>	No	No	E6681
	pGL4.50[luc2/CMV/Hygro]Vector	No	<b>CMV</b>	<i>luc2</i>	No	Hygro	E1310
	pGL4.51[luc2/CMV/Neo]Vector	No	<b>CMV</b>	<i>luc2</i>	No	Neo	E1320
	pGL4.53[luc2/PGK]Vector	No	<b>PGK</b>	<i>luc2</i>	No	No	E5011
	pGL4.54[luc2/TK]Vector	No	<b>TK</b>	<i>luc2</i>	No	No	E5061

Hygro = Hygromycin      PGK = Human phosphoglycerate kinase promoter      hCL1 = Degradation sequence derived from yeast  
 Neo = Neomycin      HSV-TK = Herpes simplex virus-thymidine kinase promoter      hPEST = Degradation sequence derived from mouse ornithine carboxylase  
 Puro = Puromycin      SV40 = Simian virus 40 promoter      IL-6 = IL-6 secretion signal  
 CMV = Cytomegalovirus promoter      minP = Minimal promoter      P2A = viral P2A peptide sequence

【ベクター・細胞株 購入における注意点】  
 各種ベクターの使用は非営利組織（大学、公的研究機関など）、営利組織にかかわらず、ライセンスプログラムの内容をご確認いただく必要があります。  
 ライセンスプログラムに関しては [www.promega.co.jp/license/](http://www.promega.co.jp/license/) をご覧ください。

## 融合タンパク質発現ベクター

製品名	マルチ クローニング サイト	発現用 プロモーター	融合遺伝子 (+融合パートナー)	蛋白質分解/ 分泌配列	動物細胞選択 マーカー (大腸菌選択マーカー)	カタログ 番号	
<b>NanoLuc® 融合タンパク質発現ベクター</b>							
標的融合 ベクター	pNLF1-HIF1A[CMV/neo]Vector	No	CMV	<b>Nluc + HIF1A</b>	No	Neo	N1381
	pNLF1-NRF2[CMV/neo]Vector	No	CMV	<b>Nluc + NRF2</b>	No	Neo	N1391
クローニング ベクター	pFN31A Nluc CMV-Hygro Flexi® Vector	Flexi®	CMV	Nluc	No	Hygro (Amp)	N1311
	pFN31K Nluc CMV-neo Flexi® Vector	Flexi®	CMV	Nluc	No	Neo (Kan)	N1321
	pFC32A Nluc CMV-Hygro Flexi® Vector	Flexi®	CMV	Nluc	No	Hygro (Amp)	N1331
	pFC32K Nluc CMV-neo Flexi® Vector	Flexi®	CMV	Nluc	No	Neo (Kan)	N1341
	pNLF1-N[CMV/Hygro]Vector	Yes	CMV	Nluc	No	Hygro	N1351
	pNLF1-C[CMV/Hygro]Vector	Yes	CMV	Nluc	No	Hygro	N1361
	pNLF1-secN[CMV/Hygro]Vector	Yes	CMV	Nluc	<b>IL-6</b>	Hygro	N1371
<b>HaloTag® 融合タンパク質発現ベクター</b>							
クローニング ベクター	pFC14A HaloTag® CMV Flexi® Vector	Flexi®	CMV (最強)	HaloTag® (C 末端)	No	(Amp)	G9651
	pFC14K HaloTag® CMV Flexi® Vector	Flexi®	CMV (最強)	HaloTag® (C 末端)	No	(Kan)	G9661
	pFN21A HaloTag® Flexi®	Flexi®	CMV (最強)	HaloTag® (N 末端)	No	(Amp)	G2821
	pFC27A HaloTag® CMV-neo Flexi® Vector	Flexi®	CMV (最強)	HaloTag® (C 末端)	No	Neo (Amp)	G8421
	pFC27K HaloTag® CMV-neo Flexi® Vector	Flexi®	CMV (最強)	HaloTag® (C 末端)	No	Neo (Kan)	G8431
	pFN28A HaloTag® CMV-neo Flexi® Vector	Flexi®	CMV (最強)	HaloTag® (N 末端)	No	Neo (Amp)	G8441
	pFN28K HaloTag® CMV-neo Flexi® Vector	Flexi®	CMV (最強)	HaloTag® (N 末端)	No	Neo (Kan)	G8451

Flexi® = Flexi® Cloning System (3つの制限酵素だけで簡単にORFの移換えが可能なクローニングシステム)  
 IL-6 = IL-6 secretion signal

- HaloTag® 融合タンパク質発現クローンについては  
Flexi HaloTag® クローン (10,000 種以上) も併せてご覧ください。  
[www.promega.co.jp/flexiclone/](http://www.promega.co.jp/flexiclone/)

製品名	マルチクローニングサイト	発現用プロモーター	融合遺伝子 (+融合パートナー)	蛋白質分解 / 分泌配列	動物細胞選択マーカー (大腸菌選択マーカー)	カタログ番号
ツウハイブリッド / ワンハイブリッド用 GAL4 DNA 結合ドメイン融合タンパク質発現ベクター						
ポジティブベクター	pBIND-ER $\alpha$ Vector	No	CMV	Gal4 DBD + ER-LBD (N末端)	No	<i>hRluc</i> -neo (Amp) E1390
	pBIND-GR Vector	No	CMV	Gal4 DBD + GR-LBD (N末端)	No	<i>hRluc</i> -neo (Amp) E1581
クローニングベクター	pFN26A (BIND) <i>hRluc</i> -neo Flexi <sup>®</sup> Vector	Flexi <sup>®</sup>	CMV	Gal4 DBD (N末端)	No	<i>hRluc</i> -neo (Amp) E1380
	pFN11A (BIND) Flexi <sup>®</sup> Vector	Flexi <sup>®</sup>	CMV	Gal4 DBD (N末端)	No	<i>hRluc</i> (Amp) C9341
VP16 転写活性化ドメイン融合タンパク質発現ベクター						
クローニングベクター	pFN10A (ACT) Flexi <sup>®</sup> Vector	Flexi <sup>®</sup>	CMV	VP16 TAD (N末端)	No	<i>hRluc</i> (Amp) C9331

※ E1390, E1581, E1380 は pGL4.35 [Luc2P/9XGal4 UAS/Hygro] Vector (カタログ番号 E1370 : 26 ページ参照) とともに核内受容体解析用ツウハイブリッドシステムとして使用します。  
 ※ C9341, C9331 は pGL4.31 [Luc2P/Gal4 UAS/Hygro] Vector (カタログ番号 C9351 : 26 ページ参照) とともにタンパク質間相互作用解析用ツウハイブリッドシステムとして使用します。

RNAi 効果評価用ベクター						
クローニングベクター	pmirGLO Dual-Luciferase <sup>®</sup> miRNA Target Expression Vector	Yes	PGK	<i>luc2</i> (N末端)	No	<i>hRluc</i> -neo (Amp) E1330
	psiCHECK <sup>™</sup> -1 Vector	Yes	SV40	<i>hRluc</i> (N末端)	No	(Amp) C8011
	psiCHECK <sup>™</sup> -2 Vector	Yes	SV40	<i>hRluc</i> (N末端)	No	<i>hluc</i> + (Amp) C8021

※ psiCHECK<sup>™</sup>-2 Vector をベースにしたヒト、マウス miRNA 標的配列クローニング済みクローンについては [www.promega.co.jp/micheck/](http://www.promega.co.jp/micheck/) をご覧ください。



## センサータンパク質発現ベクター

製品名	バリエーション	カタログ番号
cAMP 結合ルシフェラーゼセンサー		
pGloSensor <sup>™</sup> -22F cAMP Plasmid	22F	E2301
pGloSensor <sup>™</sup> -20F cAMP Plasmid	20F	E1171
Caspase 3/7 認識配列導入ルシフェラーゼセンサー		
pGloSensor <sup>™</sup> -30F DEVDG Vector	30F	CAS

※プロテアーゼセンサーの詳細については [www.promega.co.jp/proteasesensor/](http://www.promega.co.jp/proteasesensor/) をご覧ください。  
 ※専用アッセイ試薬 GloSensor<sup>™</sup> cAMP Reagent カタログ番号 E1290 (25 mg) が必要です。大サイズについてはお問い合わせください。

## 細胞センサー (安定発現細胞株)

製品名	細胞株	応答配列	レポーター遺伝子	蛋白質分解 / 分泌配列	カタログ番号
シグナル伝達解析用細胞センサー					
レポーター遺伝子導入細胞	GloResponse <sup>™</sup> NF- $\kappa$ B-RE-luc2P HEK293 Cell Line	HEK293	NF- $\kappa$ B-RE	<i>luc2</i>	hPEST E8520
	GloResponse <sup>™</sup> CRE-luc2P HEK293 Cell Line	HEK293	CRE	<i>luc2</i>	hPEST E8500
	GloResponse <sup>™</sup> NFAT-RE-luc2P HEK293 Cell Line	HEK293	NFAT-RE	<i>luc2</i>	hPEST E8510
	GloResponse <sup>™</sup> 9XGAL4UAS-luc2P HEK293 Cell Line	HEK293	9XGAL4UAS	<i>luc2</i>	hPEST E8530

●各バイアルには  $2 \times 10^6$  個の細胞が含まれる

製品名	細胞株	遺伝子改変内容	カタログ番号
cAMP モニタリング用細胞センサー			
GloSensor <sup>™</sup> cAMP HEK293 Cell Line	HEK293	cAMP 結合すると構造が変化して発光活性が回復するルシフェラーゼを発現する細胞 (バリエーション 20F)	E1261

※専用アッセイ試薬 GloSensor<sup>™</sup> cAMP Reagent カタログ番号 E1290 (25 mg) が必要です。大サイズについてはお問い合わせください。

製品名	エフェクター細胞	ターゲット細胞	カタログ番号
ADCC 抗体依存性細胞傷害アッセイ用細胞センサーキット			
ADCC Reporter Bioassay, Complete Kit (WIL2-S)	Jurkat	WIL2-S (CD20 発現細胞)	G7014
ADCC Reporter Bioassay, Complete Kit (Raji)	(Fc RIIa [V158 バリエーション] 発現、NFAT-RE-luc2 レポーター導入細胞)	Raji (CD20 発現細胞)	G7015

※上記製品には細胞の他にアッセイ試薬やコントロール抗体 (Anti-CD20) などが含まれます。

※その他のセンサータンパク質発現ベクター、細胞センサー (バイオアッセイ) については弊社までお問い合わせください。

### 【ベクター・細胞株 購入における注意点】

各種ベクターの使用は非営利組織 (大学、公的研究機関など)、営利組織にかかわらず、ライセンスプログラムの内容をご確認いただく必要があります。ライセンスプログラムに関しては [www.promega.co.jp/license/](http://www.promega.co.jp/license/) をご覧ください。

## トランスフェクション試薬

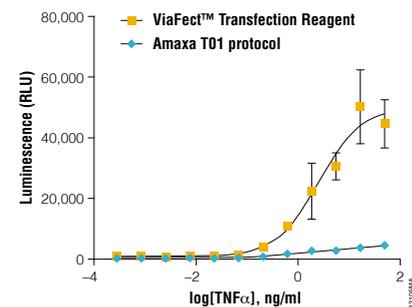
ベクターを細胞内に導入するレポーター実験を行う上で、トランスフェクションは非常に重要なステップで、効率の高い試薬を用いることでベクター導入の困難な細胞でもレポーター実験を行うことが可能になる場合もあります。トランスフェクション試薬を評価する場合、導入効率もさることながら細胞毒性にも注意を払う必要があります。導入効率が高い場合でも、死細胞や活性の低い細胞では細胞の応答を正しくとらえているとは言えません。通常のトランスフェクション試薬の評価系では GFP、 $\beta$ -ガラクトシダーゼなど導入細胞を可視化できる方法が汎用されますが、細胞毒性を含めた正しい評価を得るには定量的なアッセイがかかせません。

### ViaFect™ Transfection Reagent

ViaFect™ Transfection Reagent は一般的に使用される付着細胞だけでなく、浮遊細胞や幹細胞由来の細胞株などトランスフェクションが難しいとされる細胞でも優れたトランスフェクション効率を示します（細胞によってはエレクトロポレーションによる導入と同等以上の結果が得られています）。細胞毒性もきわめて低く、健全な細胞状態を保つため、レポーター実験に最適です。また、使用前に血清や培地を除く必要のない（試薬 / DNA 複合体を導入した後）簡便なプロトコルで、リバーストランスフェクションにも対応します。

製品名	サイズ	カタログ番号
ViaFect™ Transfection Reagent	0.75 ml	E4981
	2 × 0.75 ml	E4982

ViaFect™ 0.75 ml は 24 ウェルプレートで 500 ウェル分。



TF-1 浮遊細胞に pGL4.32 [Luc2P/NF- $\kappa$ B-RE/Hygro] Vector (NF- $\kappa$ B 応答配列を含むルシフェラーゼレポーター) を ViaFect™ Transfection Reagent または Amaxa Nucleofector® II (エレクトロポレーション) を用いてトランジェントにトランスフェクションした。翌日に細胞を TNF  $\alpha$  で 6 時間刺激し、応答を Bio-Glo™ Luciferase Reagent を用いて測定した。

## プラスミド精製

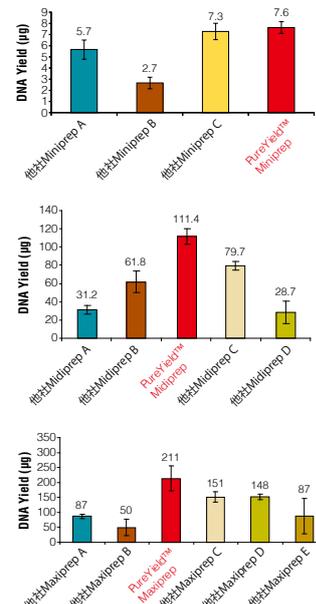
レポーターベクター / プラスミドはレポーター実験の重要な要素であり、簡便に高純度なベクターを調製することが望まれます。特に哺乳動物細胞へのトランスフェクションにおいては細胞への影響が懸念されるエンドトキシンを最低限に抑えたトランスフェクショングレードのプラスミドが必要です。

### PureYield™ Plasmid Prep System

PureYield™ Plasmid Miniprep System は高純度なプラスミド DNA を迅速に精製するためのシステムです。プラスミドからタンパク質、RNA、エンドトキシンを除去するためにデザインされたユニークな Endotoxin Removal Wash が組み込まれています。不純物の除去により、真核細胞へのトランスフェクションをはじめとする繊細なアプリケーションにも適応します。精製までの所要時間は Miniprep 約 10 分、Midiprep 約 30 分、Maxiprep 約 60 分で、精製までのステップにインプロパノール沈殿や多くの遠心操作が無く、簡便、迅速に精製することができます。このシステムは遠心法または吸引法で簡単に操作することができます。

製品名	サイズ	カタログ番号
PureYield™ Plasmid Miniprep System	100 回分	A1223
	250 回分	A1222
PureYield™ Plasmid Midiprep System	25 回分	A2492
	100 回分	A2495
PureYield™ Plasmid Maxiprep System	10 回分	A2392
	25 回分	A2393

※ midi, maxiprep にはスイングローターの遠心機が必要です。



他社トランスフェクショングレードのプラスミド精製キットとの収量比較

## マルチアッセイ

プロメガのセルベースアッセイにはマルチアッセイに対応する組合せが数多く存在しており、よりハイコンテンツなデータを簡便に取得することができます。レポーターアッセイに対して（特にステイブル）、細胞の増減を同時に調べることはデータの解釈を容易にし、精度を高めます。細胞の生存性、毒性試験についてはリアルタイムで経時的に測定できる新しい技術も開発されています。また、その他の細胞内マーカー（カスパーゼ活性、P450 活性、他）を測定することにより多様なプロファイリングを取得することができます。

発光レポーターアッセイとのマルチアッセイには通常蛍光アッセイ法が用いられますが、タイミングやサンプルを分離することで発光×発光アッセイを行うことも可能です。マルチアッセイの詳細については弊社テクニカルサービス部までお問い合わせください。

### Multi-Assay Compatible Assay Systems

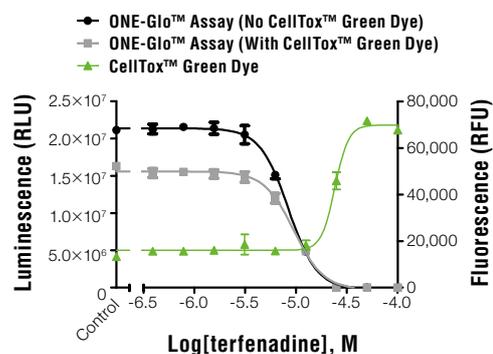
**RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay** は細胞の還元力（代謝 [MT]）を測定することにより培養中の生細胞数をリアルタイムに測定するための細胞非溶解性の発光ホモジニアスアッセイ法です。アッセイでは予め培養細胞に NanoLuc® luciferase と細胞透過性の NanoLuc® 基質前駆体を添加するだけです。生存細胞はこの特殊な前駆体基質を還元し、NanoLuc® ルシフェラーゼの基質に変換します。この基質は細胞内から培地に拡散し、NanoLuc® ルシフェラーゼにより迅速に消費され生存細胞数に相関する発光シグナルを生じます。細胞応答（還元能の増減）は数分以内に発光シグナルの変化として現れ、1回の試薬供給で最大 72 時間生細胞のままモニタリングすることができます。

**CellTox™ Green Cytotoxicity Assay** は細胞死による細胞膜の完全性の変化を測定します。生細胞からは排出され、死細胞由来の DNA を選択的に染色する非対称のシアニン色素を用いています。細胞から遊離した DNA にこの色素が結合すると蛍光特性が大幅に増強されます。しかし、生細胞では蛍光の増加は検出されません。そのため、死細胞の DNA に結合することで得られた蛍光シグナルは細胞毒性に比例します。CellTox™ Green Dye は細胞に対して毒性を示さず、72 時間後でも安定したシグナルを維持するため、カイネティック測定あるいはエンドポイント測定による毒性効果の決定に理想的です。

**CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay** は、細胞溶解を伴わずに生細胞を測定する蛍光アッセイで、試薬を 1 種類加えるだけの簡便な方式を採用しています。本アッセイでは、恒常的に発現する特定のプロテアーゼをマーカーとして利用します。このプロテアーゼ活性は、インタクトな生細胞内に限定され、細胞透過性の蛍光性ペプチド基質がインタクトな細胞内に入ると、このプロテアーゼ活性により切断され、生細胞数に比例した蛍光シグナルを生じます。

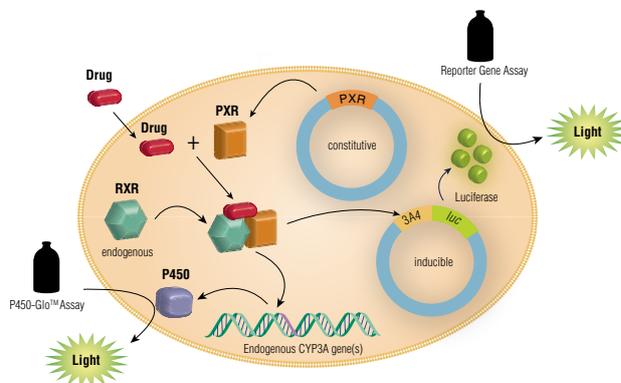
製品名	サイズ	カタログ番号
RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay	100 回分	G9711
	10 × 100 回分	G9712
CellTox™ Green Cytotoxicity Assay	10 ml	G8741
	5 × 10 ml	G8742
CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay	10 ml	G6080
	5 × 10 ml	G6081
MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay	10 ml	G9200
	5 × 10 ml	G9201
Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7	10 ml	G7790
P450-Glo™ CYP3A4 Assay with Luciferin-IPA	100 ml	G7791
	50 ml	V9001
P450-Glo™ CYP1A2 Induction/Inhibition Assay	10 ml	V9002
	50 ml	V8421
P450-Glo™ CYP2B6 Assay	10 ml	V8422
	50 ml	V8321
		V8322

100 回分および 10 ml は 96 ウェルプレートで 100 ウェル分に相当（但し、P450-Glo™ については 10 ml は 96 ウェルプレートで 200 ウェル分に相当）。



ONE-Glo™ (ホタルレポーター) と CellTox™ Green (細胞毒性) のマルチアッセイ

発光シグナルは細胞死およびタンパク質合成低下により減少。細胞膜の損傷により CellTox™ Green 蛍光色素が DNA に結合するため蛍光シグナルは増加。ONE-Glo™ アッセイはホタルルシフェラーゼを恒常的に発現する HEK293 細胞で実施した。



P450 とルシフェラーゼレポーターのマルチアッセイ

P450 は薬物の代謝 / 排泄に深く関与しており、薬剤による P450 の発現誘導（転写活性の増加）および酵素阻害（代謝活性の低下）を調べることは薬剤の開発を行う上で非常に重要です。3A4 プロモーターを導入したルシフェラーゼベクターおよび PXR を恒常的に発現するベクターをトランスフェクションすることにより、3A4 の転写活性と代謝活性を測定することも可能です（詳細についてはお問い合わせください）。

# Reporter GUIDE

## ルミノメーター

ルミノメーターは生物発光を高感度に測定する装置で、ルシフェラーゼレポーターアッセイの普及により一般的になり、現在では細胞ベースの様々なアッセイや生化学的測定にも使用されています。プロメガのルミノメーターは、数多くの発光アッセイ試薬を開発しアッセイケミストリーを熟知した技術者のアイデアを反映させた、高感度で使いやすい測定装置です。

GloMax  
DISCOVER  
EXPLORER

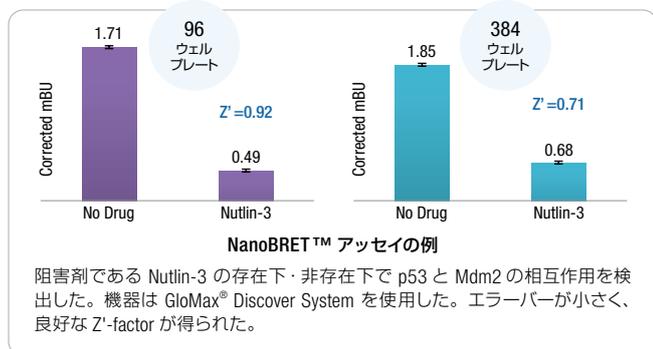


### GloMax® Discover / Explorer System

GloMax® Discover System はプロメガのアッセイシステムに関する英知を結集してデザインした Ready-to-Use の多機能性マルチモードリーダー（発光、蛍光、吸光 [UV / 可視光]、BRET、FRET）で、フィルターによる 2 色発光測定やカイネティクス測定にも対応します。プリインストールされたプロメガ試薬のアッセイプロトコルで直ぐに実験を開始することができ、ネットワークへのアクセスによりデータを望みのドライブに転送することができます。フィルターパッドとフィルター自動切り替え機能によりマルチプレックスアッセイやカイネティクス実験にも対応します。プレートマスキングシステム (96 / 384 スイッチング) によりウェル間のクロストークを極限まで抑えた高感度測定が可能となり、ワイドなダイナミックレンジが得られます。新発売された GloMax® Explorer System は、検出機能を発光および蛍光に限定したスタートモデルで、初期投資を抑えることができます。また必要に応じてモジュール（可視吸光 / UV-可視吸光検出や BRET / FRET 測定機能）を追加して、段階的なアップグレードが可能になりました。

#### 特長

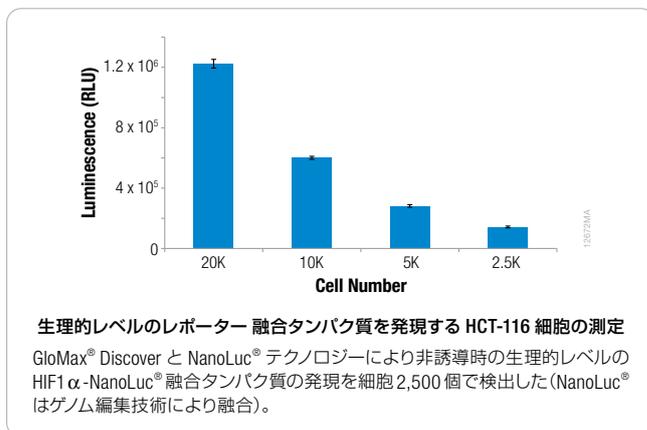
- 発光、蛍光、吸光 [UV / 可視光] 測定および BRET、FRET 対応
- 9 桁以上のダイナミックレンジ (発光測定)
- 6 ~ 384 ウェルプレートおよび自動分注ロボットによる HTS にも対応 (ハイスピード測定: 96 ウェル [1 分間]、384 ウェル [3 分間])
- 攪拌機能 / 温度管理機能
- 付属のタブレット PC によるタッチスクリーン操作、LAN 接続
- スタートモデル GloMax® Explorer System は初期投資を低減



#### GloMax® Discover / Explorer System の装備比較

Model	Lum	Fluor.	Vis Abs	UV-Vis Abs	BRET/FRET
GloMax® Discover GM3000	✓	✓		✓	✓
GloMax® Explorer GM3500	✓	✓	✓	Upgrade	Upgrade
GloMax® Explorer GM3510	✓	✓	Upgrade	Upgrade	Upgrade

アップグレードについては弊社までお問い合わせください。



製品名	サイズ	カタログ番号
GloMax® Discover System	1 台	GM3000
GloMax® Explorer System, Fully Loaded Model (発光 / 蛍光 / 可視吸光)	1 台	GM3500
GloMax® Explorer System, Luminescence and Fluorescence (発光 / 蛍光)	1 台	GM3510

**Renta MAX** ルミノメーターをお貸しいたします!  
www.promega.co.jp/rentamax/

日本語 Web site : [www.promega.co.jp](http://www.promega.co.jp)

テクニカルサービス • Tel. 03-3669-7980 • E-Mail : [prometec@jp.promega.com](mailto:prometec@jp.promega.com)

## プロメガ株式会社

本社 〒103-0001  
東京都中央区日本橋小伝馬町1-5 PMO日本橋江戸通ビル 7F  
Tel. 03-3669-7981

大阪事務所 〒541-0051  
大阪市中央区備後町4-1-3 御堂筋三井ビルディング  
Tel. 06-6202-4581

※製品の仕様、価格については 2025 年 7 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