

高発光・長時間安定型レポーターアッセイ試薬

ピッカジーン®MelioraStar-LT® 発光試薬 (MLT10, MLT100, MLT1000)

取扱説明書

I. 試薬の概要	2
II. 製品構成	2
III. 使用方法	3
IV. トラブルシューティング	4
V. 関連製品	5
VI. 使用上の注意	6

保存温度	-80°C
使用期限	外箱に記載

I. 試薬の概要

ピッカジーン® MelioraStar-LT® 発光試薬「MLT」は、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼを利用したルシフェラーゼアッセイのための発光試薬です。細胞溶解成分が含まれているため、培養プレートに試薬を添加するだけで、「細胞溶解～発光測定までの工程」を1ステップで行なうことができます。また、発光が安定しているため、多検体スクリーニングに使用可能です。

<特徴>

- ①安定性 発光半減期＝約 90 分
- ②高発光 発光強度が高い
- ③簡便性 操作は1ステップ(細胞溶解成分入りの1液型試薬)
- ④迅速性 試薬添加後、5分で測定可能

レポーターアッセイでは、発現解析したい遺伝子の発現制御領域下に、発現を可視化するための外来遺伝子を人為的に組み込み、プラスミドを細胞内に導入します。導入された遺伝子産物の量(酵素活性等)を蛍光・発光法によって検出することで、転写活性を推定する方法です。

レポータータンパク質として用いられている北米産ホタル・ルシフェラーゼは、61kDaの単量体タンパク質であり、酵素活性の発揮に翻訳後修飾を必要としません。そのため、翻訳終了と同時にレポーター遺伝子として機能します。

ホタル・ルシフェラーゼ発光反応は、ルシフェラーゼによるルシフェリンの酸化反応を通して光を生じる反応です。ルシフェリンは、ルシフェラーゼ、マグネシウムイオン(Mg²⁺)の存在下においてATPと反応した後、酸素(O₂)と反応して励起状態のオキシルシフェリンを生成し、基底状態に戻る際に光を発します。

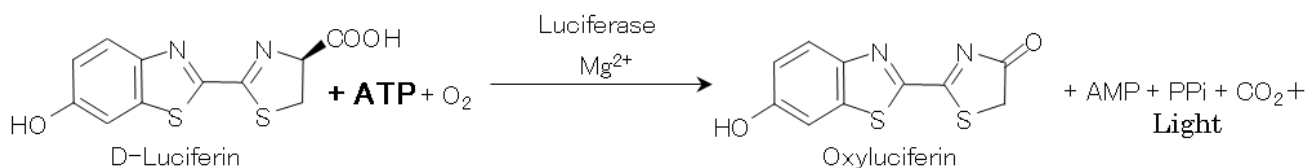


図 1. ホタル・ルシフェラーゼ発光反応機構

II. 製品構成

		製品		
		ピッカジーン® MelioraStar-LT® 発光試薬		
		MLT10	MLT100	MLT1000
構成 品	ピッカジーン® MelioraStar-LT® 発光試薬 (10ml)	1本	—	—
	ピッカジーン® MelioraStar-LT® 発光試薬 (50ml)	—	2本	20本

Ⅲ. 使用方法

試薬の準備

ピッカジーン®
MelioraStar-
LT®発光試薬

◆本試薬は、光や温度、物理的な刺激による影響を受けます。
直射日光が当たる場所や蛍光灯の真下での作業、試薬融解時の 30℃以上でのインキュベーターや、混合時のボルテックスミキサー等を用いた激しい攪拌は避けて下さい。また、一度の測定で使い切らない場合は、凍結融解の繰り返しを避けるため、必要量ずつ小分けにして-80℃で遮光保存することをお勧めします。

<測定プロトコル> ルシフェラーゼアッセイ(96well プレートの場合)

①	トランスフェクション	1. 北米産ホタル (<i>Photinus Pyralis</i>) ルシフェラーゼ遺伝子を含むプラスミドを細胞にトランスフェクションし、培養します。 ☞ 培養条件は、実験目的に応じて設定して下さい。
②	発光測定	2. 室温に戻した MelioraStar-LT®発光試薬 100 µl を添加します。 3. 室温で 5 分間、静置します。 4. 23℃に設定したルミノメーターで発光量を測定します。 ☞ 発光試薬の添加から測定開始までの時間を統一して下さい。

IV. トラブルシューティング

問題	原因	解決法
発光しない。 発光量が低い。	発現量が少ない。 細胞数が少ない。	<ul style="list-style-type: none"> ● 非常に少量のルシフェラーゼを検出する場合は、測定した検体の発光量からバックグラウンドシグナルを差し引くことが重要です。 <p><バックグラウンドシグナルの測定方法></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. トランスフェクションしていない細胞を準備します（培養条件は検体と同様）。 2. 検体を測定する場合と同様に、発光試薬 100 μl を添加します。 3. 室温で5分間静置し、ルミノメーターで発光量を測定します。
	試薬が劣化している。	<ul style="list-style-type: none"> ● 保存状態により、試薬が劣化している可能性があります。試薬の保存方法を確認して下さい(1 ページ参照)。 ● ルシフェラーゼスタンダード酵素(別売品:FL-50)を用いて、発光試薬の性能確認を行って下さい。
	発光試薬が室温に戻っていない。	<ul style="list-style-type: none"> ● ルシフェラーゼ発光反応は、温度によって大きく影響されます。発光試薬が室温に戻っていることを確認して下さい。
	測定機器で設定した測定時間(積算時間)が短い。	<ul style="list-style-type: none"> ● 測定感度はルミノメーターに依存します。1 検体あたりの測定時間(積算時間)を長く設定して下さい。
発光量が高く、ルミノメーターの測定可能範囲を超えている。	ルシフェラーゼの発現量が多い。	<ul style="list-style-type: none"> ● 事前に、ルミノメーターで直線性が得られる範囲を確認して下さい。 ● 播種数を減らして下さい。または、トランスフェクション後の培養日数を短くして下さい。
	測定機器で設定した測定時間(積算時間)が長い。	<ul style="list-style-type: none"> ● 1 検体あたりの測定時間(積算時間)を短く設定して下さい。
測定値のばらつきが大きい。	発光試薬の添加から測定を開始するまでの時間が異なる。	<ul style="list-style-type: none"> ● 発光試薬の添加から測定開始までの時間を統一して下さい。
	融解後の試薬成分が十分に混ざっていない。	<ul style="list-style-type: none"> ● 融解後の試薬は十分に混合してから使用して下さい。その際、ボルテックスミキサー等の激しい攪拌は避け、転倒混和等により穏やかに攪拌して下さい。

V. 関連製品

製品名	メーカーコード	構成	保存条件
ホタルルシフェラーゼ 酵素セット	FL-50	ホタルルシフェラーゼ酵素 (10 µg/ml、50 µl) 希釈液 (30 ml)	-80°C
ピッカジーン カセットベクター	PGV-CS	ピッカジーン カセットベクター (20 µg)	-20°C
ピッカジーン ベーシックベクター	PGV-B	ピッカジーン ベーシックベクター (20 µg)	-20°C
ピッカジーン エンハンサーベクター	PGV-E	ピッカジーン エンハンサーベクター (20 µg)	-20°C
ピッカジーン プロモーターベクター	PGV-P	ピッカジーン プロモーターベクター (20 µg)	-20°C
ピッカジーン コントロールベクター	PGV-C	ピッカジーン コントロールベクター (20 µg)	-20°C
ピッカジーン カセットベクター2	PGV-CS2	ピッカジーン カセットベクター2 (20 µg)	-20°C
ピッカジーン ベーシックベクター2	PGV-B2	ピッカジーン ベーシックベクター2 (20 µg)	-20°C
ピッカジーン エンハンサーベクター2	PGV-E2	ピッカジーン エンハンサーベクター2 (20 µg)	-20°C
ピッカジーン プロモーターベクター2	PGV-P2	ピッカジーン プロモーターベクター2 (20 µg)	-20°C
ピッカジーン コントロールベクター2	PGV-C2	ピッカジーン コントロールベクター2 (20 µg)	-20°C

①カセットベクター (PGV-CS)

ベクター内ヘルシフェラーゼ遺伝子を組み込むためのプラスミド。

②ベーシックベクター (PGV-B)

ルシフェラーゼ遺伝子を持ち、SV40 由来のプロモーター、エンハンサーを含まない。プロモーターを持つ DNA 鎖をルシフェラーゼ遺伝子上流へ挿入可 (方向性: 考慮)。エンハンサーを持つ DNA 鎖をルシフェラーゼ遺伝子上・下流に挿入可 (方向性: 無関係)。各種プロモーターの転写活性テスト、プロモーターに及ぼす各種エンハンサーの転写活性テストに使用。

③エンハンサーベクター (PGV-E)

SV40 由来のエンハンサーをルシフェラーゼ遺伝子の下流に挿入。プロモーターを持つ DNA 鎖をルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入可 (方向性: 考慮)。各種プロモーターの転写活性テストに使用。

④プロモーターベクター (PGV-P)

SV40 由来のプロモーターをルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入。エンハンサーを持つ DNA 鎖をルシフェラーゼ遺伝子上・下流に挿入可 (方向性: 無関係)。プロモーターに及ぼす各種エンハンサーの転写活性テストに使用。

⑤コントロールベクター (PGV-C)

SV40 由来のプロモーター、エンハンサーを持つ陽性コントロール。転写活性のモニタリング、他のプロモーター、エンハンサーとの活性比較に使用。

<ピッカジーン® ベクター2>

パーオキシソームへの局在化を抑え、真核細胞での発現効率を向上させた新改良ルシフェラーゼ遺伝子 (Luc+) を組み込んだ上記各種ベクター

VI. 使用上の注意

- ご使用前に必ず安全データシート(SDS)をお読み下さい。
- 本製品を研究用途以外には使用しないで下さい。
- 日本国内のみで使用して下さい。
- 使用期限と保存条件を必ず守って下さい。
- 本製品を火気に近づけないで下さい。
- 本製品の廃棄は、お客様の施設の廃棄ルールに従って処分して下さい。
- 本製品に使用する他の試薬・器具・機械は、使用前に必ず各々の使用説明書をよく読み、その指示に従って調整・準備を行って下さい。
- 本製品に使用する他の試薬・器具は必ず滅菌して下さい。
- 材質によっては、試薬の付着により腐食・変色する場合があります。試薬が付着した器具・機械は蒸留水でよく洗浄して下さい。
- 試薬類を誤って飲み込んだ場合は、応急処置として水を飲ませ、直ちに医師の診断を受けて下さい。
- 手袋、保護メガネ等により適切な身体保護を施し、試薬類の身体への接触を避けて下さい。試薬類が目に入った場合や皮膚に付着した場合は、応急処置として水で洗い流し、直ちに医師の診断を受けて下さい。
- その他、不明な点がございましたら、下記問い合わせ先までご連絡ください。

問い合わせ先

東洋ビーネット株式会社
〒104-0031 東京都中央区京橋二丁目2番1号
E-mail: b-net.bio@artiencegroup.com
HP: <https://artiencegroup.com>