

ピッカジーン® デュアル シーパンジー発光キット (PGD-S、PD-11、PD-10)

取扱説明書

I. キットの概要	2
II. 製品構成	5
III. 使用方法	6
IV. トラブルシューティング	9
V. 関連製品	11
VI. 使用上の注意	11

保存温度	-20°C ※開封後の「ルシフェラーゼ・スタンダード酵素」及び 調製後のピッカジーン®発光試薬Ⅱは、-80°C保管 (調製後の発光試薬Ⅱを-20°Cで保管した場合は1ヶ月以内に使用)
使用期限	外箱に記載

I. キットの概要

レポーターアッセイは、真核生物における遺伝子発現/制御や細胞生理等の研究(ex レセプター活性、転写因子、細胞内シグナリング、mRNA プロセッシング、タンパク質の折りたたみ解析など)に利用されています。これらの研究では、実験の制度を向上させるために 2 種類のレポーター(デュアルレポーター)を使用する手法が広く用いられており、単一の系において 2 種類のレポーター遺伝子を同時に発現させ、各レポーター酵素の活性を測定します。“テスト”レポーター活性は、実験で設定した条件が遺伝子発現に与える影響を反映し、コトランスフェクションされた“コントロール”レポーター活性は、個々の実験データを内部標準(Internal Control)化するためのベースラインとしての応答を示します。テストレポーター活性をコントロールレポーター活性によって標準化することから、実験の精度を損なうであろう実験固有の変動要因(ex 培養プレートの違い、細胞数の違い、トランスフェクション効率の違い等)を取り除くことができます。さらに、細胞溶解効率等の差異によって生じるアッセイ間のデータのばらつきも、インターナルコントロールによって解決できます。このように、デュアルレポーターアッセイでは、外部からの影響を低減させることにより、より信頼性のある実験データ解析を可能とします。

「ピッカジーン®デュアル シーパンジー発光キット」では、同一サンプル中で発現したホタル(*photinus pyralis*, 北米産ホタル)、シーパンジー(*Renilla reniformis*, ウミシイタケ)の両ルシフェラーゼ活性を連続して測定できます。「ピッカジーン®発光試薬Ⅱ」の添加によりホタルルシフェラーゼを発光させた後、同チューブに「シーパンジー発光試薬」を添加し、ホタルルシフェラーゼの発光を消光させると同時にシーパンジールシフェラーゼを発光させます。両レポーターともに高感度かつ直線性を持った測定が可能であり、宿主細胞において内在的な活性を有していません。また、トランスフェクションした細胞あるいは無細胞系における転写/翻訳のどちらにおいても、両レポーターの迅速な定量が可能です。

<デュアルルシフェラーゼの発光について>

ホタルとシーパンジーのルシフェラーゼは、進化的には異なった起源をもつため、全く異なった構造の酵素および発光基質から発光反応を行います。本キットでは、これを利用して、ホタルルシフェラーゼ(テストレポーター)による発光反応を停止させながら、シーパンジールシフェラーゼ(コントロールレポーター)の発光反応を活性化させ、両発光反応を識別します。

①ホタルルシフェラーゼ

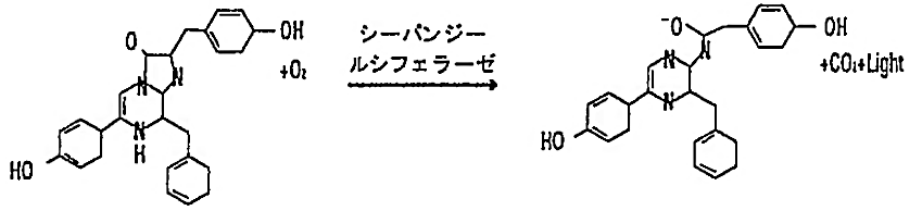
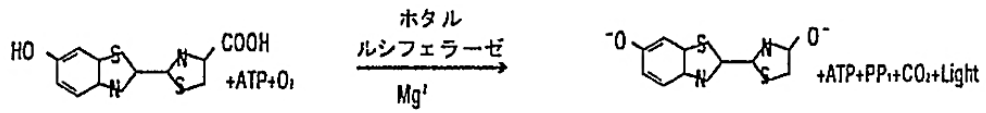
61kDa の単量体タンパク質で、酵素活性の発現に翻訳後プロセッシングを必要としないため、翻訳終了と同時にレポーター遺伝子として機能します。発光反応における光子の放出は、アデノシン三リン酸(ATP)、 Mg^{2+} 、 O_2 を必要としたホタル・ルシフェリンの酸化反応により生じます(図 1)。

②シーパンジールシフェラーゼ

36kDa の単量体タンパク質で、ウミホタル(自然界)から単離されたものは 3%の糖質を含みます。ホタルルシフェラーゼと同様に、活性発現に翻訳後修飾を必要とせず、翻訳後直ちにレポーター遺伝子として機能します。シーパンジールシフェラーゼによる発光反応には、 O_2 とセレンテラジンを使用します(図 1)。

セレンテラジンは、低レベルではありますが、酵素なしに溶液中で自動発光する性質があります。さらに、細胞溶解に広く用いられている非イオン性界面活性剤(TritonX-100 等)によって、セレンテラジンはかなりの強度をもつ自動発光を生じます。本キットに含まれる細胞溶解剤は、この自動発光を引き起こす成分を含んでいません。また、本キットでは、「ピッカジーン®発光試薬Ⅱ」と「シーパンジー発光試薬」の 2 種類を用いて、セレンテラジンの自動発光を抑えるようデザインしていま

す。



セランテラジン

図 1. ホタル/シーパンジールシフェラーゼによる発光反応

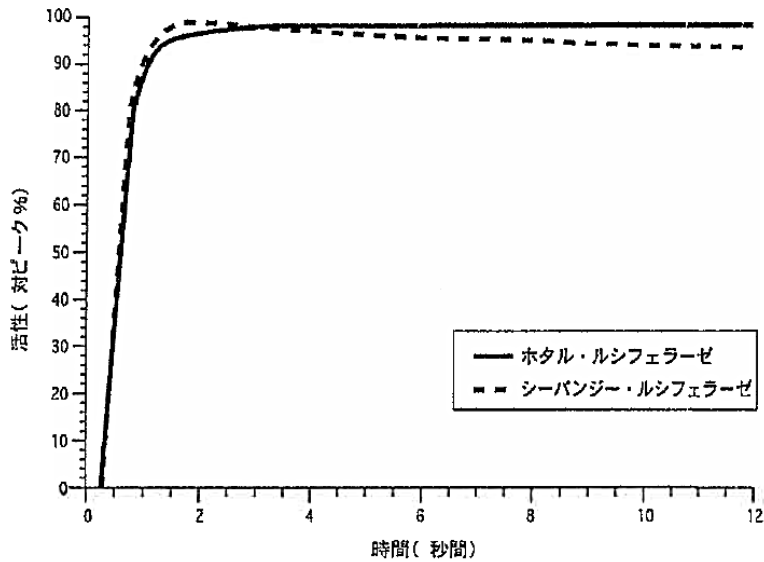


図 2. 本キットで得られるホタル/シーパンジールシフェラーゼの発光

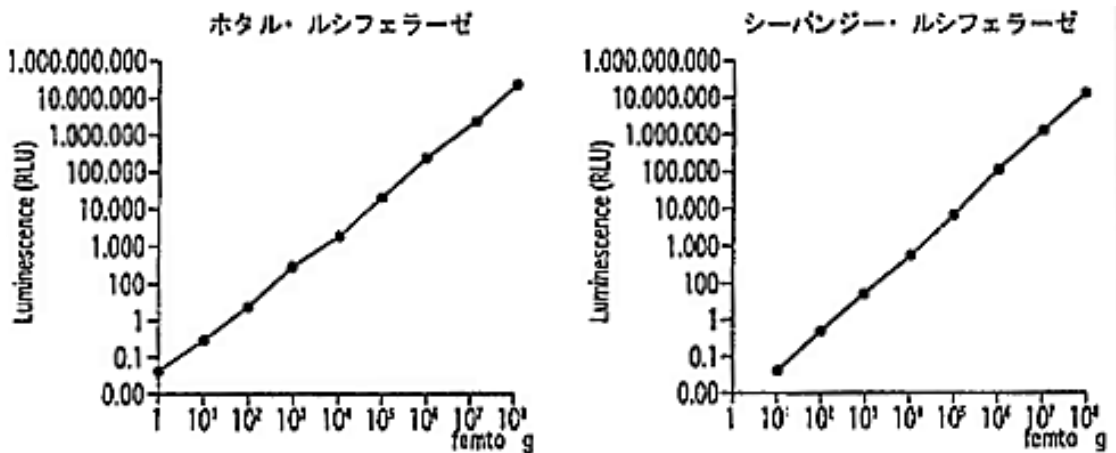


図 3. ホタル/シーパンジールシフェラーゼの測定レンジの比較

ホタル/シーパンジールシフェラーゼを 1mg/ml ゼラチンを含む「ピッカジーン®デュアル 細胞溶解剤」で

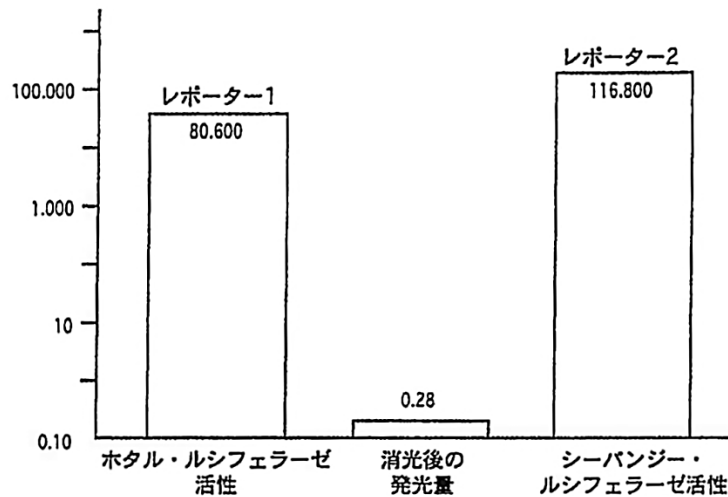


図 4. 「シーパンジー発光試薬」添加前後におけるルシフェラーゼ活性の測定
 ホタル/シーパンジールシフェラーゼを含む同一サンプル(1mg/ml ゼラチンを含む「ピッカジーン®デュアル 細胞溶解剤」で溶解したもの) 20 μ l に、プロトコルに従って各発光試薬を添加した。「シーパンジー発光試薬」の添加により、ホタルルシフェラーゼ活性は $1/10^5$ に消光し、それと同時にシーパンジーの発光が開始した。

<ピッカジーン®デュアルシーパンジー 5倍濃 細胞溶解剤の特徴>

- * スクレイピングや凍結融解が不要
- * 多検体処理が可能(ウェルプレートによるアプリケーション、自動化装置での使用に適している)
- * セレンテラジンの自動発光を最小限に抑制
 - ☞他の細胞溶解剤を使用した場合、セレンテラジンによるバックグラウンド発光が生じます。
- * ライセート中のタンパク質定量が可能
 - ☞ライセート液を希釈する場合は、界面活性剤や還元剤を含まない緩衝液(または水)を使用して下さい。

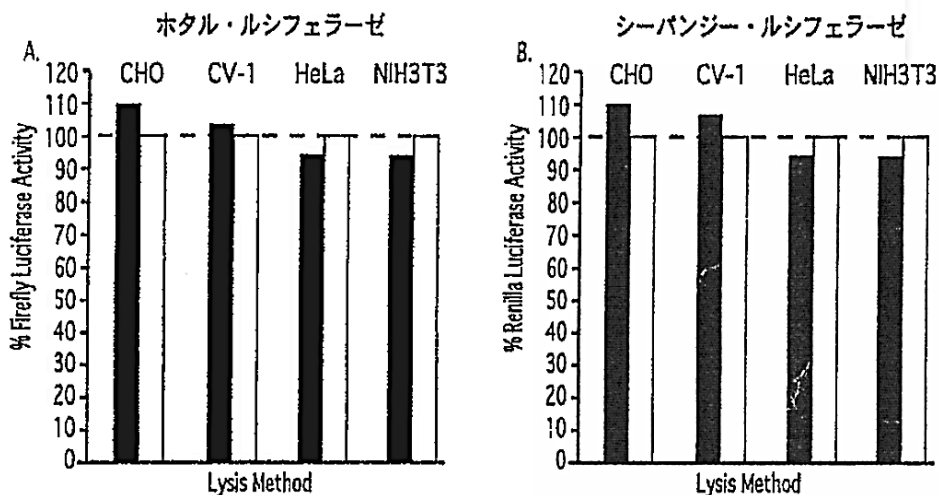


図 5. 溶解法の違いによる活性比較
 (ピッカジーン®デュアルシーパンジー 5倍濃 細胞溶解剤を使用)
 4種類の培養細胞に、ホタルルシフェラーゼとシーパンジールシフェラーゼをコトランスフェクションした。それぞれのライセートは、本細胞溶解剤に 15 分間浸漬する方法 (I / ■)、または、

接着細胞をスクレイピングしてから1回の凍結融解処理を施す方法(Ⅱ/□)により調製した。
 ※グラフは、(Ⅱ)の発光量を100%とした場合の比率で表示。

Ⅱ. 製品構成

		製品		
		ピッカジーン® デュアル シーパンジー発光キット		
		PGD-S (100 回用)	PD-11 (100 回用 × 10)	PD-10 (1000 回用)
構成 品	ピッカジーン®発光基質 (凍結乾燥品)	1 本	10 本	—
	ピッカジーン®発光試薬Ⅱ緩衝液 (10 ml)	1 本	10 本	—
	シーパンジー発光基質溶液 (200 μl)	1 本	10 本	—
	シーパンジー発光試薬緩衝液 (10 ml)	1 本	10 本	—
	5 倍濃 細胞溶解剤 (30 ml)	1 本	1 本	1 本
	ルシフェラーゼスタンダード酵素 (10 μg/ml、 1.64×10^{-10} mol/ml、50 μl)	1 本	1 本	2 本
	ピッカジーン®発光基質 ※PD-10 用 (凍結乾燥品)	—	—	1 本
	ピッカジーン®発光試薬Ⅱ緩衝液 (105 ml)	—	—	1 本
	シーパンジー発光基質溶液 (1.05 ml)	—	—	2 本
	シーパンジー発光試薬緩衝液 (105 ml)	—	—	1 本
シーパンジー発光試薬ボトル	—	—	1 本	

Ⅲ. 使用方法

試薬の準備	
ピッカジーン® 発光試薬Ⅱ の調製	<ol style="list-style-type: none"> ピッカジーン®発光試薬Ⅱ緩衝液、ピッカジーン®発光基質(凍結乾燥品)を室温に戻します。 発光基質(凍結乾燥品)が入った瓶に、発光試薬Ⅱ緩衝液(PGD-S・PD-11 の場合は 10ml、PD-10 の場合は 105ml)を添加します。 瓶をゆっくりと数回反転させ、十分に混合します。 ☞調製後の“ピッカジーン®発光試薬Ⅱ(調製済)”は、<u>-80℃にて遮光保存</u>して下さい。-20℃で保存した場合は、1ヶ月以内に使用して下さい。 <p>◆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トや、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。</p>
シーパンジー 発光試薬 の調製 (用時調製)	<p>☞<u>シーパンジー発光試薬は、用時調製することを推奨します。</u> (調製液を保存する場合は、ガラス容器に入れて-20℃で保管し、15日以内に使用して下さい。)</p> <p>活性低下率 22℃保管(48時間) : 約 8% 4℃保管(15日間) : 約 13% 凍結融解(6回) : 約 15%</p> <p>☞「シーパンジー発光基質溶液」は弱酸性のため、皮膚や目に付着しないよう注意して下さい。また、揮発性・引火性があるため、火気に十分注意して下さい。</p> <p>☞「シーパンジー発光基質溶液」は融解時、まれに析出することがあります。その場合、37℃で15分程度加温して下さい。</p> <ol style="list-style-type: none"> シーパンジー発光試薬緩衝液、シーパンジー発光基質溶液を室温に戻します。 必要量を計算し、発光基質溶液をガラスバイアル瓶(またはシリコン処理されたポリプロピレンチューブ)に採取します。 2.で採取した発光基質溶液の 49 倍量の発光試薬緩衝液を添加し(50 倍希釈)、容器をゆっくりと数回反転させ、十分に混合します。 ☞調製後の“シーパンジー発光試薬(調製済)”は、直ちに使用して下さい。-20℃で保存した場合は、15日以内に使用して下さい。
1 倍濃 細胞溶解剤 の調製 (5 倍希釈)	<p>☞<u>用時調製することを推奨します。</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 「ピッカジーン®デュアル 5 倍濃 細胞溶解剤」に 4 倍量の滅菌水を添加し、5 倍希釈します。 これを“1 倍濃細胞溶解剤”とします。

☞事前に、「ルシフェラーゼスタンダード酵素」を用いて検量線を作成し、ご使用のルミノメーターで直線性が得られる発光強度範囲を確認しておくことを推奨します(8 ページ参照)。

<測定プロトコル> デュアルルシフェラーゼアッセイ(24well プレートの場合)

①	コトランスフェクション	<p>1. 北米産ホタルルシフェラーゼ遺伝子、シーパンジールシフェラーゼ遺伝子を含むプラスミドを細胞にコトランスフェクションし、培養します。</p> <ul style="list-style-type: none"> ☞ 培養条件は、実験目的に応じて設定して下さい。 ☞ 両遺伝子の発現量を事前に確認した上で、ベクターの比率と量を最適化して下さい。 																		
②	細胞溶解	<p>2. 培地を除去し、PBS でウェルを洗浄します。</p> <p>3. 1 倍濃 細胞溶解剤 100 μl を添加し、細胞表面が溶解剤で覆われるようにプレートを数回まわします。</p> <ul style="list-style-type: none"> ☞ 細胞溶解剤の添加量は、細胞表面が完全に覆われる必要最小量として設定しています。使用プレートの違いにより、細胞表面が完全に覆われない場合は、細胞溶解剤の液量を増やして下さい。 <p>各プレートにおける細胞溶解剤の使用量の目安(1well あたり)</p> <table border="1" data-bbox="608 786 1241 1043"> <thead> <tr> <th>プレートサイズ</th> <th>溶解剤 (μl)</th> <th>PBS (ml)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>96well プレート</td> <td>25</td> <td>0.1</td> </tr> <tr> <td>48well プレート</td> <td>65</td> <td>0.3</td> </tr> <tr> <td>24well プレート</td> <td>100</td> <td>0.5</td> </tr> <tr> <td>12well プレート</td> <td>250</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>6well プレート</td> <td>500</td> <td>2</td> </tr> </tbody> </table> <p>4. 室温で 15 分間、ゆっくり攪拌します。</p> <ul style="list-style-type: none"> ☞ 細胞種により溶解の程度が異なります。使用する細胞種に合わせて、30 分以内で溶解時間を最適化して下さい。 	プレートサイズ	溶解剤 (μ l)	PBS (ml)	96well プレート	25	0.1	48well プレート	65	0.3	24well プレート	100	0.5	12well プレート	250	1	6well プレート	500	2
プレートサイズ	溶解剤 (μ l)	PBS (ml)																		
96well プレート	25	0.1																		
48well プレート	65	0.3																		
24well プレート	100	0.5																		
12well プレート	250	1																		
6well プレート	500	2																		

③	発光測定	<p>5. ライセート(4.の溶液)を 1.5ml チューブに移し、氷上に置きます。</p> <ul style="list-style-type: none"> ☞ライセート回収後は、直ちに発光測定を行うことを推奨します。 ☞やむを得ずライセートを保存する場合は、凍結融解を繰り返さないよう小分けにして-80℃で保存して下さい。-20℃で保存した場合は、1ヶ月以内に使用して下さい。 ☞ライセート中のタンパク質量を定量する場合は、回収したライセート液を遠心分離(4℃、最大回転数、30 秒間)し、得られた上清を用いてタンパク質アッセイを行って下さい。 <p>6. 5.の溶液を抜き取り(20 µl 以下)、測定用チューブに入れます。</p> <ul style="list-style-type: none"> ☞発現量に応じてサンプル採取量を調整して下さい。 <p>7. 室温に戻した「ピッカジーン[®]発光試薬Ⅱ(調製済)」100 µl を添加し、軽く振って攪拌後、ルミノメーターで発光量を測定します(積算時間:10 秒)。</p> <ul style="list-style-type: none"> ☞発光試薬(調製済)を添加した後は、素早く測定を開始して下さい。また、発光試薬(調製済)の添加から測定開始までの時間を統一して下さい。タイムラグの差異は、発光量の減衰による測定誤差の原因となります。 <p style="margin-left: 20px;">ex) 発光試薬の添加から 5 秒後に測定を開始する</p> <p>8. 7. の測定チューブをルミノメーターから取り出して、「シーパンジー発光試薬(調製済)」100 µl を添加し、軽く振って攪拌後、再びルミノメーターで発光量を測定します(積算時間:10 秒)。</p> <ul style="list-style-type: none"> ☞シーパンジールシフェラーゼ活性のみを測定する場合でも、20 µl のライセートに対して 100 µl の発光試薬を添加して下さい。
---	------	--

**<測定プロトコル> ルシフェラーゼスタンダード酵素を用いた検量線の作成
(直線性が得られる濃度範囲の確認)**

①	試薬の準備	<p>1. ピッカジーン[®]発光試薬Ⅱ(調製済)を室温に戻します。</p> <p>2. ルシフェラーゼスタンダード酵素を氷上で融解します。</p>
②	希釈系列の調製	<p>3. 1mg/ml BSA(またはゼラチン)を添加した 1 倍濃 細胞溶解剤を用いて、ルシフェラーゼスタンダード酵素の 10 倍希釈系列を調製します。</p>
③	発光測定	<p>4. 3.で調製した溶液を測定用チューブに入れます(20 µl 以下)。</p> <ul style="list-style-type: none"> ☞液量は、検体を測定する場合のライセート量と同量にして下さい。 <p>5. 室温に戻した発光試薬(調製済)100 µl を添加し、軽く振って攪拌後、ルミノメーターで発光量を測定します。</p> <ul style="list-style-type: none"> ☞発光試薬(調製済)を添加した後は、素早く測定を開始して下さい。また、発光試薬(調製済)の添加から測定開始までの時間を統一して下さい。タイムラグの差異は、発光量の減衰による測定誤差の原因となります。 <p style="margin-left: 20px;">ex) 発光試薬の添加から 5 秒後に測定を開始する</p>
④	検量線の作成	<p>6. ルシフェラーゼ濃度と発光量の対数グラフ(相関グラフ)を作成します。</p>

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。	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を用いて、発光試薬(調製済)の性能確認を行って下さい。
	ルシフェラーゼの発現量が少ない。	<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> <p>①ホタルルシフェラーゼの場合</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、ライセートを調製します(条件は検体と同様)。 2. 検体を測定する場合と同様に、ピッカジーン®発光試薬Ⅱ(調製済)100 µl を添加し、発光量を測定します。 <p>②シーパンジールルシフェラーゼの場合</p> <p>(1)セレンテラジンによる自然発光</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、ライセートを調製します(条件は検体と同様)。 2. 検体を測定する場合と同様に、シーパンジー発光試薬(調製済)100 µl を添加し、発光量を測定します。 <p>(2)ホタルルシフェラーゼによる残存発光</p> <p>少量の残存発光は避けられませんが、ホタルルシフェラーゼの発光は 100,000 倍以上消光されるため、シーパンジールルシフェラーゼによる発光がホタルに比べて 1,000 倍以下でない限り、実際のアッセイでは問題となりません。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 高レベルにホタルルシフェラーゼが発現している細胞のライセートを調製します。 2. 検体を測定する場合と同様に、ピッカジーン®発光試薬Ⅱ(調製済)100 µl を添加し、ホタルによる発光量を測定します。 3. シーパンジー発光試薬(調製済)100 µl を添加し、発光量を測定します。 4. 3.で測定した発光量からセレンテラジンによる自然発光量(上記②(1))を差し引きます。
	発光試薬(調製済)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(調製済)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。 	

問題	原因	解決法
		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。 ● 測定時の検体量を減らして下さい。または、検体を希釈して下さい。
	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(調製済)の添加から測定開始までの時間を各検体で統一して下さい。
	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
ピッカジーン®デュアル 5倍濃 細胞溶解剤	PLD-30	ピッカジーン®デュアル 5倍濃 細胞溶解剤 (30ml)	-20°C
シーパンジー SV40 コントロールベクター	pRL-SV40	シーパンジー SV40 コントロールベクター (20 µg)	-20°C
シーパンジー TK コントロールベクター	pRL-TK	シーパンジー TK コントロールベクター (20 µg)	-20°C
シーパンジー CMV コントロールベクター	pRL-CMV	シーパンジー CMV コントロールベクター (20 µg)	-20°C
シーパンジー null コントロールベクター	pRL-null	シーパンジー null コントロールベクター (20 µg)	-20°C

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@artiencengroup.com
HP: <http://www.toyo-b-net.co.jp/>