

## ピッカジーン®PA 発光キット (PGL-PA1)

### 取扱説明書

I. キットの概要	2
II. 製品構成	2
III. 使用方法	3
IV. 使用上の注意	5

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 調製後の発光試薬は、-80°C保管
使用期限	外箱に記載

## I. キットの概要

ピッカジーン®PA 発光キット「PGL-PA1」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キットです。従来のルシフェラーゼアッセイでは、酵素-基質による反応開始と同時に瞬間的に発光した後、速やかに減衰してしまうという欠点がありましたが、本キットを使用することにより、高発光量(従来比:約 10 倍)かつ安定した発光反応(数分以上)を得ることが出来ます。

また、キット内の細胞溶解剤により調製した細胞ライセートは、そのままタンパク質アッセイ(Bradford 法、Lowry 法、BCA 法)に使用することが出来るため、レポーターアッセイの測定値をタンパク質量により補正することが可能です。

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( $Mg^{2+}$ )の存在下において ATP と反応した後、酸素( $O_2$ )と反応して励起状態のオキシル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)。

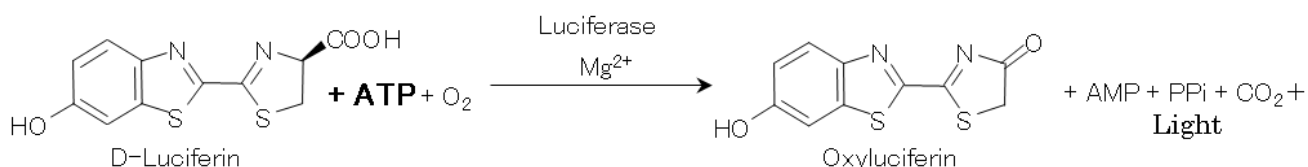


図 1. ホタル・ルシフェラーゼ発光反応機構

## II. 製品構成

製品名	メーカーコード	構成
ピッカジーン® PA 発光キット	PGL-PA1	・発光試薬(凍結乾燥品) ・発光試薬緩衝液(10ml) ・PA 用細胞溶解剤(100ml) ・ルシフェラーゼ標準液 (10 $\mu$ g/ml、 $1.64 \times 10^{-10}$ mol/ml、50 $\mu$ l)

### Ⅲ. 使用方法

<キット構成成分以外に必要なもの(必要に応じて)>  
タンパク質アッセイ試薬

試薬の準備	
発光試薬の調製	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 発光試薬緩衝液、発光試薬(凍結乾燥品)を室温に戻します。</li> <li>2. 発光試薬(凍結乾燥品)が入ったバイアル瓶のゴム栓をゆっくりと開け、緩衝液 10ml を添加して、再度ゴム栓を閉じます。 ☞ バイアル瓶内は陰圧状態です。開封時にパウダーが飛散しないよう、ゆっくりとゴム栓を持ち上げ、切り込み部分から空気を入れてからゴム栓を外して下さい。</li> <li>3. バイアル瓶をゆっくりと数回反転させ、十分に混合します。 ☞ 発光試薬(凍結乾燥品)に緩衝液を加えて調製した“<u>発光試薬(調製済)</u>”は、<u>-80℃にて遮光保存</u>して下さい。</li> </ol> <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>

#### <測定プロトコル> ルシフェラーゼ標準液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	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 発光試薬(調製済)を室温に戻します。</li> <li>2. ルシフェラーゼ標準液を氷上で融解します。</li> </ol>
②	希釈系列の調製	<ol style="list-style-type: none"> <li>3. PA 用細胞溶解剤を用いて、ルシフェラーゼ標準液の 10 倍希釈系列を調製します。</li> </ol>
③	発光測定	<ol style="list-style-type: none"> <li>4. 3.で調製した溶液を測定用チューブに入れます(20~50 µl)。 ☞ 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。</li> <li>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。 ☞ 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。 ex) 発光試薬の添加から 5 秒後に測定を開始する</li> </ol>
④	検量線の作成	<ol style="list-style-type: none"> <li>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。</li> </ol>

<測定プロトコル> ルシフェラーゼアッセイ(24well プレートの場合)

①	トランスフェクション	<p>1. 北米産ホタル (<i>Photinus Pyraris</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。</p>																		
②	細胞溶解	<p>2. 培地を除去し、PBS でウェルを洗浄します。          3. 室温に戻した PA 用細胞溶解剤 100 <math>\mu</math>l 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。          ☞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。          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="608 667 1241 925"> <thead> <tr> <th>プレートサイズ</th> <th>溶解剤 (<math>\mu</math>l)</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>200</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。          ☞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。</p>	プレートサイズ	溶解剤 ( $\mu$ 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	200	1	6well プレート	500	2
プレートサイズ	溶解剤 ( $\mu$ 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	200	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。          ☞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<math>-80^{\circ}\text{C}</math>で保存し、1 週間以内に測定を行って下さい。          6. 12,000 <math>\times</math> g で 15 分間、遠心分離します(<math>4^{\circ}\text{C}</math>)。          7. 上清を新しいチューブに移し、氷上に置きます。          8. 7.の溶液 20~50 <math>\mu</math>l を抜き取り、測定用チューブに移します。          ☞発現量に応じてサンプル採取量を調整して下さい。          9. 室温に戻した発光試薬(調製済)100 <math>\mu</math>l 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。          ☞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。          ex) 発光試薬の添加から 5 秒後に測定を開始する</p>																		
④	(タンパク質の定量)	<p>10. 7.の溶液を用いて、タンパク質アッセイを行います。          ☞Bradford 法、Lowry 法、BCA 法によりタンパク質量を定量して下さい。</p>																		

## IV. 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](mailto:b-net.bio@artiencegroup.com)  
HP: <https://artiencegroup.com>