

ピッカジーン® 発光キット (PGL100 PGL1500)

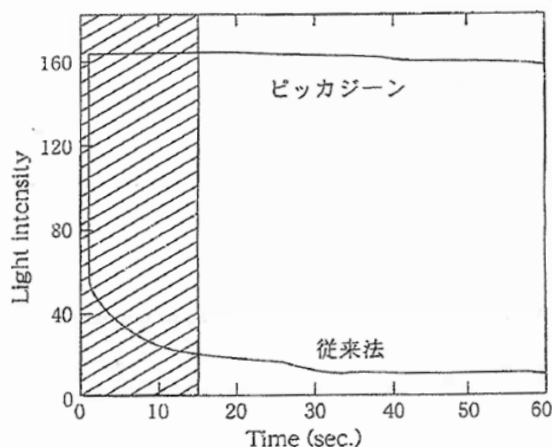
取扱説明書

I. キットの概要	2
II. 製品構成	3
III. 使用方法	3
IV. トラブルシューティング	6
V. 関連製品	7
VI. 使用上の注意	8

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® 発光キット「PGL100」「PGL1500」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。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。



NIH/3T3 細胞に Rous sarcoma virus プロモーター(pRSVL)を導入し、48時間培養後、ルシフェラーゼアッセイにより発光量を比較した。

従来の基質による発光では、急速な減衰により傾斜部がロスタイムとなり、測定できない。これは 1 分間測定時の全発光量の約 50%に当たる。

図 1. ピッカジーン®と従来のルシフェラーゼアッセイの比較

<主な用途>

- ①遺伝子の発現解析(プロモーター、エンハンサーの転写活性解析)
- ②細胞中の mRNA の構造、作用機序の解明
- ③遺伝子調節機能を持つタンパク質の構造と作用機序の解明
- ④トランスジェニック植物・動物における器官特異的な発現様式の解析
- ⑤ウイルスや細胞のマーカー

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)。

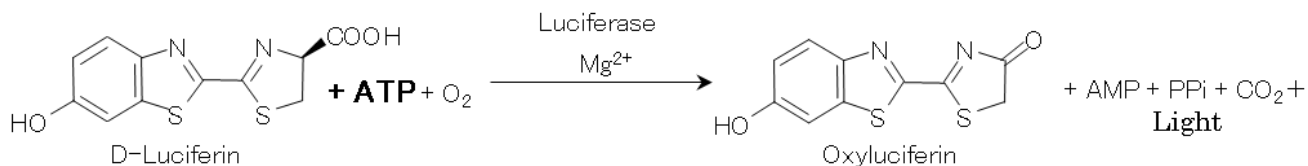


図 2. ホタル・ルシフェラーゼ発光反応機構

II. 製品構成

		製品	
		ピッカジーン® 発光キット	
		PGL100	PGL1500
品 構 成 品	発光基質 (凍結乾燥品)	1本	5本
	緩衝液 (10 ml)	1本	5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

III. 使用方法

<キット構成以外に必要なもの>
細胞溶解剤(別売品あり:PGC-50)

試薬の準備

発光試薬 の調製

- 緩衝液、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。
- 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。
☞ 発光基質(凍結乾燥品)に緩衝液を加えて調製した“発光試薬(調製済)”は、-80℃にて遮光保存して下さい。

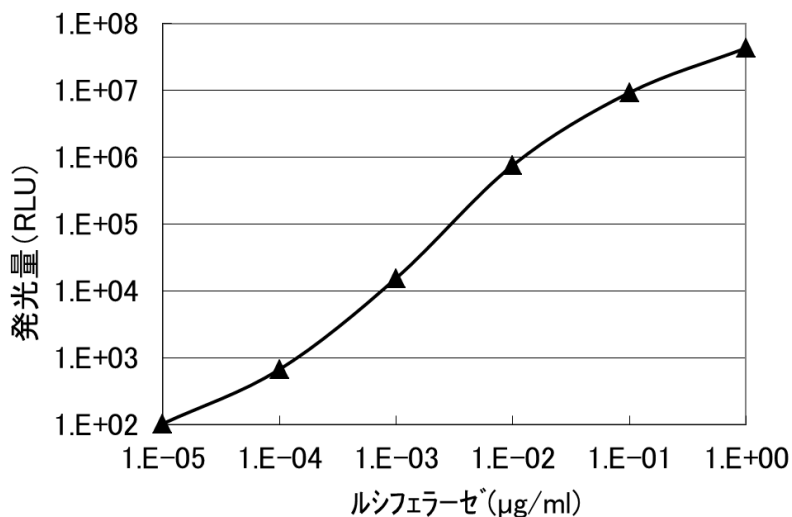
◆本試薬は、光や温度、物理的な刺激による影響を受けます。
直射日光が当たる場所や蛍光灯の真下での作業、試薬融解時の 30℃以上でのインキュベートや、混合時のボルテックスミキサー等を用いた激しい攪拌は避けて下さい。また、一度の測定で使い切らない場合は、凍結融解の繰り返しを避けるため、必要量ずつ小分けにして-80℃で遮光保存することをお勧めします。

＜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	1. 発光試薬(調製済)を室温に戻します。 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。
②	希釈系列の調製	3. 1mg/ml BSA を添加した細胞溶解剤(別売品あり:PGC-50)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。
③	発光測定	4. 3.で調製した溶液を測定用チューブに入れます(20~50 μ l)。 ☞ 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。 5. 室温に戻した発光試薬(調製済)100 μ 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
④	検量線の作成	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。

＜参考データ＞

ルシフェラーゼ濃度と発光量の相関



<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	<ol style="list-style-type: none"> 北米産ホタル (<i>Photinus Pyrraris</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	細胞溶解	<ol style="list-style-type: none"> 培地を除去し、PBS でウェルを洗浄します。 細胞溶解剤(別売品あり:PGC-50) 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。 ☞ 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) <table border="1" data-bbox="608 629 1241 887"> <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>200</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>6well プレート</td> <td>500</td> <td>2</td> </tr> </tbody> </table> <ol style="list-style-type: none"> 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。 	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	200	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	200	1																		
6well プレート	500	2																		
③	発光測定	<ol style="list-style-type: none"> 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-80°Cで保存し、1 週間以内に測定を行って下さい。 12,000 \times g で 15 分間、遠心分離します(4°C)。 上清を新しいチューブに移し、氷上に置きます。 7.の溶液 20~50 μl 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。 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 																		

※植物をサンプルとする場合

液体窒素で急速凍結したサンプルを粉碎し、細胞溶解剤を添加して細胞を溶解します(発光測定の操作は上記同様)。

※菌体をサンプルとする場合

菌体ペレットを冷却した細胞溶解剤で再懸濁し、氷で冷却しながら超音波破碎(15~30 秒/回、数回実施)を行い、菌体を溶解します(発光測定の操作は上記同様)。

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。
	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。
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® 培養細胞溶解剤 LUC	PGC-50	5 倍濃ピッカジーン®培養細胞溶解剤 (30ml)	-20°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>