

ピッカジーン® 発光基質液 (PGL5500 PGL2000)

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	5
V. 関連製品	6
VI. 使用上の注意	7

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® 発光基質液「PGL5500」「PGL2000」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。

<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)。

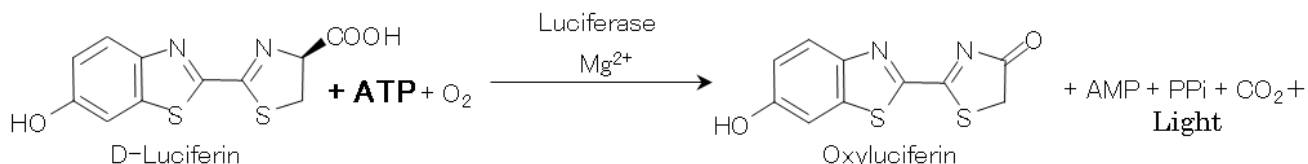


図 1. ホタル・ルシフェラーゼ発光反応機構

II. 製品構成

		製品	
		ピッカジーン®発光基質液	
		PGL5500	PGL2000
構成 品	ピッカジーン®発光基質液 (50ml 500 回用)	1 本	4 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	2 本

Ⅲ. 使用方法

<キット構成成分以外に必要なもの>
細胞溶解剤(別売品あり:PGC-50)

試薬の準備	
発光基質液	◆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. 発光基質液を室温に戻します。 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 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。 5. 室温に戻した発光基質液 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。 ☞ 発光基質液を添加した後は、素早く測定を開始して下さい。また、発光基質液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) 発光基質液の添加から 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。

<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 882"> <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。 室温に戻した発光基質液 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。 ☞ 発光基質液を添加した後は、素早く測定を開始して下さい。また、発光基質液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) 発光基質液の添加から 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、発光基質液の性能確認を行って下さい。
	発光基質液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。発光基質液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。	発光基質液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"> ● 発光基質液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>