

ReStart LUC[®] full Kit (RS-F100)

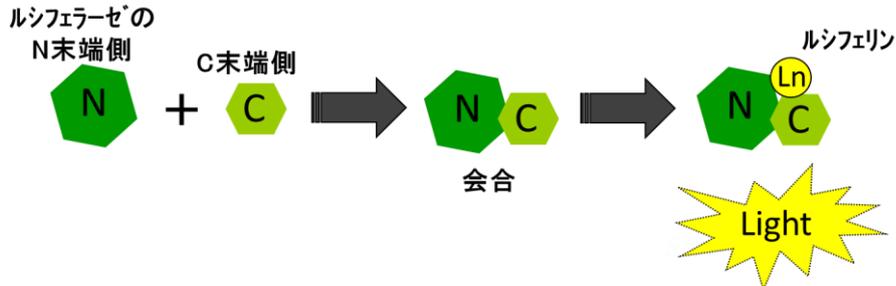
ReStart LUC[®] assay Kit (RS-A100, RS-A500, RS-A1000)

取扱説明書

| | |
|-----------------|----|
| I. キットの概要 | 2 |
| II. 製品構成 | 3 |
| III. 使用方法 | 4 |
| IV. ベクターマップ・配列 | 7 |
| V. 解析例 | 11 |
| VI. トラブルシューティング | 13 |
| VII. 使用上の注意 | 14 |

| | |
|------|---|
| 保存温度 | -80°C <構成品別の保存温度> N Protein 試薬:-80°C その他 : -20°C以下(-80°C可) ※調製後の RS 発光試薬は-80°C(遮光) |
| 使用期限 | 外箱に記載 |

I. キットの概要



本キットでは、“特定の位置で切断して生物発光能を失活させた北米産ホタルルシフェラーゼを再構成することにより、発光能を回復させる”手法を簡便に行うことができます。

ルシフェラーゼのC末端側を検出タグとすることで、分泌シグナルの解析(図1、解析例Ⅰ・Ⅱ)や、タンパク質の細胞内小器官移行解析(図2、解析例Ⅲ)などの研究にご使用いただけます。

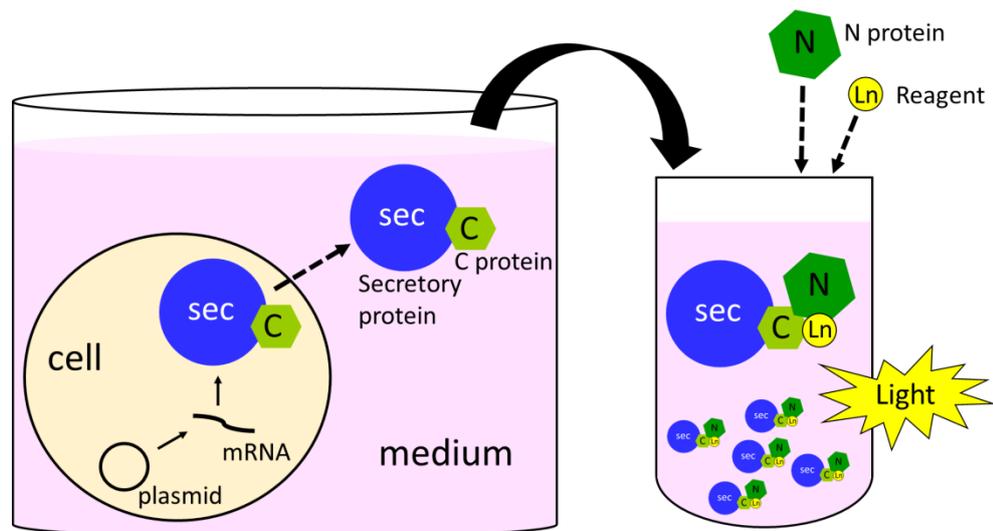


図1. 分泌シグナルペプチドの解析方法

- ①北米産ホタルルシフェラーゼのC末端側(C Protein)遺伝子とシグナルペプチド遺伝子を結合させ、細胞に導入して発現させる。
- ②分泌されたシグナルペプチドを含む培地に、北米産ホタルルシフェラーゼのN末端側(N Protein)を含むN Protein 試薬を添加してルシフェラーゼを再構成し、発光量を測定する。

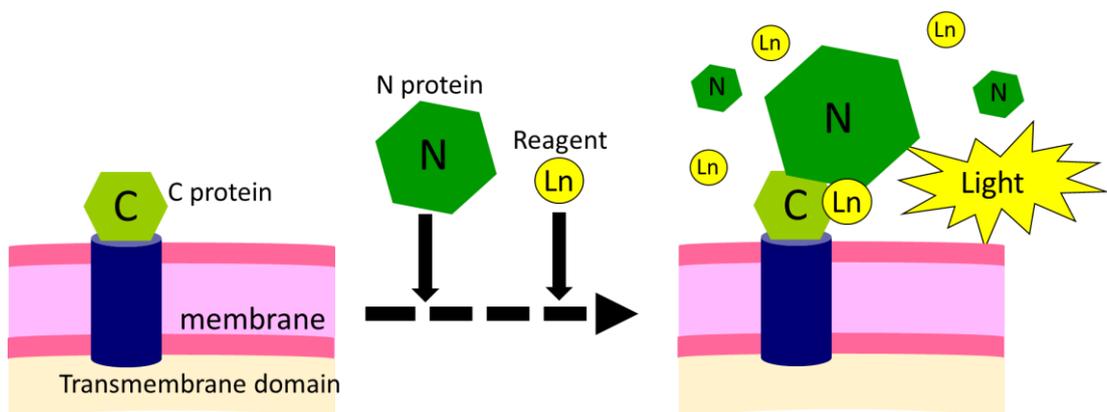


図2. タンパク質の細胞内移行解析方法

- ①細胞膜上に発現するよう設計されたベクターに北米産ホタルルシフェラーゼのC末端側(C Protein)遺伝子を導入し、細胞で発現させる。
- ②北米産ホタルルシフェラーゼのN末端側(N Protein)を含むN Protein 試薬を添加し、細胞膜上でルシフェラーゼを再構成して発光量を測定する。

II. 製品構成

| | | 製品 | | | |
|----------|--|--------------------------------------|------------------------------------|---------------------|-----------------------|
| | | ReStart LUC [®] full Kit | ReStart LUC [®] assay Kit | | |
| | | 100 回用 (RS-F100) | 100 回用 (RS-A100) | 500 回用 (RS-A500) | 1000 回用 (RS-A1000) |
| 製品 構成 | RS 発光基質 (凍結乾燥品) | 1 本 | 1 本 | 5 本 | 10 本 |
| | RS 発光基質溶解液 (10 ml) | 1 本 | 1 本 | 5 本 | 10 本 |
| | C Protein 試薬 (200 µl) | 1 本 | 1 本 | 5 本 | 10 本 |
| | N Protein 試薬 (100 µl) | 1 本 | 1 本 | 5 本 | 10 本 |
| | N Protein 試薬 希釈液 (900 µl) | 1 本 | 1 本 | 5 本 | 10 本 |
| | C Protein Control Vector (0.5 µg/µl, 20 µl) | 1 本 | — | — | — |
| | C Protein Test Vector (0.5 µg/µl, 20 µl) | 1 本 | — | — | — |

Ⅲ. 使用方法

| 試薬の準備 | |
|-----------------|--|
| RS 発光試薬の調製 | <ol style="list-style-type: none">RS 発光基質溶解液、RS 発光基質(凍結乾燥品)を室温に戻します。RS 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、RS 発光基質溶解液 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。 ☞RS 発光基質(凍結乾燥品)に RS 発光基質溶解液を加えて調製した“RS 発光試薬(調製済)”は、<u>-80°Cにて遮光保存して下さい。</u> <p>◆本試薬は、温度や物理的な刺激による影響を受けます。 試薬融解時の 30°C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、繰り返しの凍結融解により、発光性能が低下することがあります。一度の測定で使い切らない場合は、必要量ずつ小分けにし、凍結融解をできるだけ避けることをお勧めします。</p> |
| N Protein 試薬の希釈 | <ol style="list-style-type: none">N Protein 試薬、N Protein 試薬希釈液を氷上で融解します。N Protein 試薬の全量を N Protein 試薬希釈液が入ったチューブに入れ、ピペティングでゆっくりと混合します。 <p>◆本試薬は、温度や物理的な刺激による影響を受けます。 試薬は氷上にて取り扱い、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°Cで保存して下さい。</p> |

※「発光量が低い」、「試薬が劣化していないことを確認したい」等の場合に実施すること

<N protein 試薬(希釈済)、RS 発光試薬(調製済)の性能確認>

- C Protein 試薬 2 μ l を発光測定用チューブに入れ、細胞培養用培地(又は PBS) 100 μ l を添加します。
- N Protein 試薬(希釈済) 10 μ l を添加し、軽く振って攪拌後、室温で 5 分間(PBS の場合は 10 分間)静置します。
- RS 発光試薬(調製済) 100 μ l を添加し、軽く攪拌後、ルミノメーターで発光量を測定します。

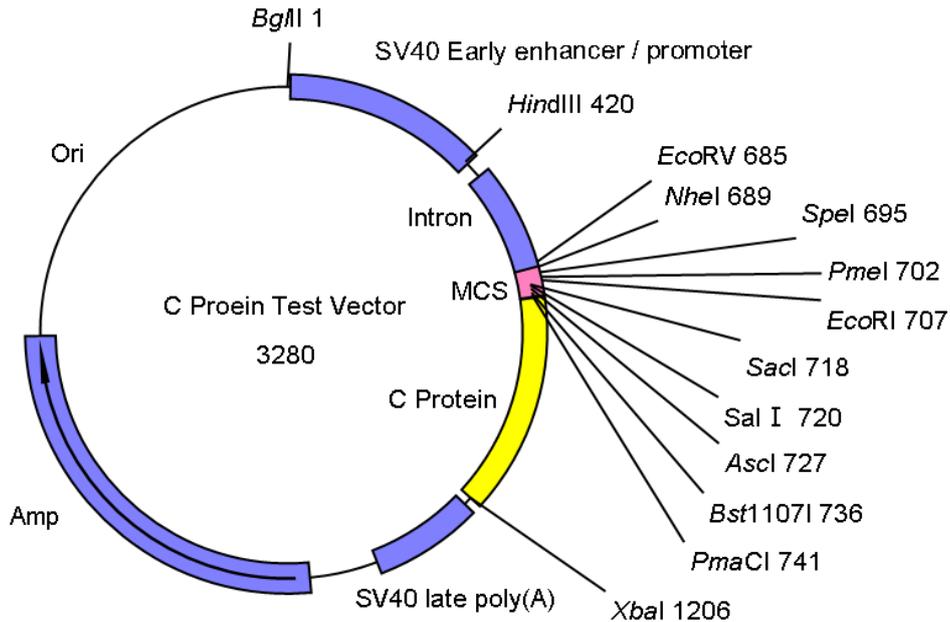
<測定プロトコル> 分泌タンパク質の解析

| | | |
|---|---------------|--|
| ① | クローニング | <p>1. C Protein Test Vector に、解析したいタンパク質をコードする遺伝子をクローニングします。その際、開始コドンも入れて下さい。</p> <p>☞ ポジティブコントロールとして、分泌タンパク質 (Milk Growth Factor-E8) が導入された C Protein Control Vector を用いることが出来ます。</p> |
| ② | トランスフェクション・発現 | <p>2. ステップ 1. で作製した発現用プラスミドを細胞にトランスフェクションします。</p> <p>3. 細胞を 24 時間以上培養し、目的のタンパク質を十分に発現させます。</p> <p>☞ 目的のタンパク質に合わせて発現時間を調節して下さい。発現時間が不足した場合、解析するための十分なタンパク質量を得られない可能性があります。</p> |
| ③ | ルシフェラーゼの再構成 | <p>4. 培地 100 μl を抜き取り、発光測定用チューブに移します。</p> <p>5. 氷上で融解した N Protein 試薬 (希釈済) 10 μl を添加し、軽く振って攪拌後、室温で 5 分間静置します。</p> <p>☞ 発現させた C Protein と N Protein 試薬 (希釈済) の会合時間を統一して下さい。N Protein 試薬 (希釈済) の添加からステップ 6. の RS 発光試薬添加までの時間を一定にすることが重要です。</p> |
| ④ | 発光測定 | <p>6. 室温に戻した RS 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> <p>☞ RS 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。</p> <p>ex) 発光試薬の添加から 5 秒後に測定を開始する</p> |

| <測定プロトコル> | | 細胞膜表面上に発現したタンパク質の解析 |
|-----------|---------------|--|
| ① | クローニング | <p>1. C Protein をコードする遺伝子を細胞膜上で発現するベクター (例 Invitrogen 社 pDisplay vector) にクローニングします。または、C Protein Test Vector に、膜貫通領域を含む遺伝子配列を挿入します。</p> |
| ② | トランスフェクション・発現 | <p>2. ステップ 1. で作製した発現用プラスミドを細胞にトランスフェクションします。</p> <p>3. 細胞を 24 時間以上培養し、目的のタンパク質を十分に発現させます。 ☞ 目的のタンパク質に合わせて発現時間を調節して下さい。発現時間が不足した場合、解析するための十分なタンパク質量を得られない可能性があります。</p> |
| ③ | ルシフェラーゼの再構成 | <p>4. 細胞懸濁液 100µl を発光測定用チューブに移します。 ☞ 接着細胞の場合、トリプシン-EDTA により細胞を剥がすことは避けて下さい。トリプシンにより、発現したタンパク質が分解され、ルシフェラーゼの再構成が行われなくなります。 ☞ 多検体測定する場合等、次ステップにてルシフェラーゼ再構成時間を完全に統一することが難しい場合は、培地を PBS に置き換えた上でステップ 5 に進むことを推奨します。 i) 細胞懸濁液 100 µl を遠心用チューブに回収します。 ii) 遠心分離後、培地を除去します。 iii) PBS 100 µl を添加して細胞を再懸濁し、全量を発光測定用チューブに移します。 ☞ 発現量が低い場合は、遠心操作により、細胞密度を 2 倍に高めることを推奨します。 i) 細胞懸濁液 100 µl を遠心用チューブに回収します。 ii) 遠心分離後、培地を除去します。 iii) 新しい培地 (又は PBS) 50 µl を添加し、細胞を再懸濁します。 iv) iii) の細胞懸濁液 50 µl を発光測定用チューブに移します。</p> <p>5. 氷上で融解した N Protein 試薬 (希釈済) 10 µl を添加し、軽く振って攪拌後、室温で 5 分間 (PBS に置き換えた場合は 10 分間) 静置します。 ☞ 発現させた C Protein と N Protein 試薬 (希釈済) の会合時間を統一して下さい。N Protein 試薬 (希釈済) の添加からステップ 6. の RS 発光試薬添加までの時間を一定にすることが重要です。 ☞ ステップ 4. にて細胞懸濁液を 30 µl に濃縮した場合でも、N Protein の添加量は変更せず、10 µl 添加して下さい。</p> |
| ④ | 発光測定 | <p>6. 室温に戻した RS 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。 ☞ RS 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。 ex) 発光試薬の添加から 5 秒後に測定を開始する</p> |

IV. ベクターマップ・配列

<C Protein Test Vector>



| | |
|----------------------------------|-----------|
| SV40 early enhancer/promoter | 7-425 |
| chimeric intron | 462-684 |
| T7 promoter / priming site | 666-683 |
| Multiple cloning site | 683-744 |
| C Protein gene | 747-1205 |
| SV40 late polyadenylation signal | 1224-1447 |
| Ampicillin resistance gene | 1594-2453 |

C Protein Test Vector 配列

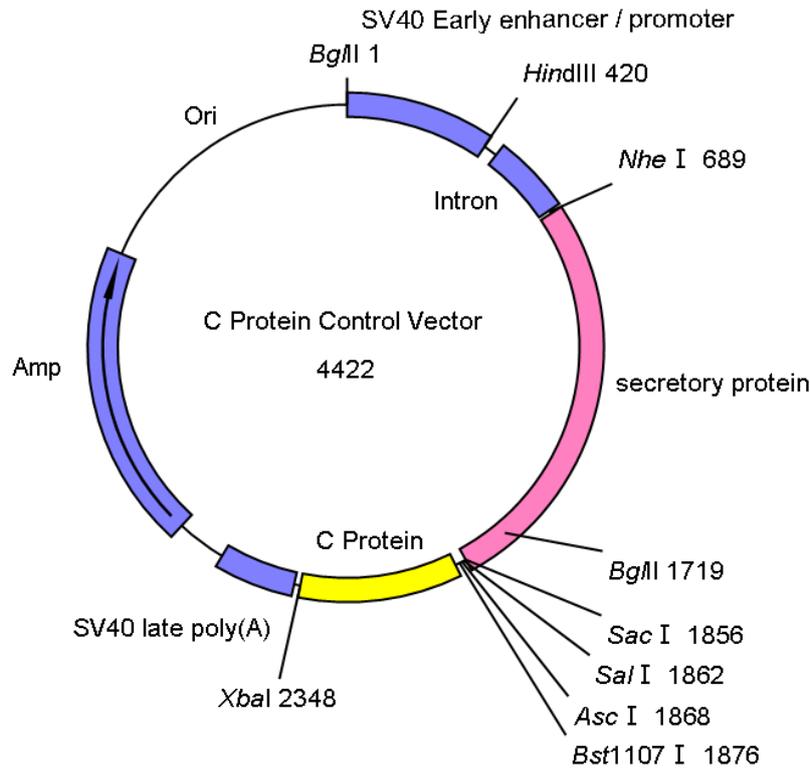
```

1 AGATCTGCGC AGCACCATGG CCTGAAATAA CCTCTGAAAG AGGAACTTGG TTAGGTACCT
61 TCTGAGGCGG AAAGAACCAG CTGTGGAATG TGTGTCAGTT AGGGTGTGGA AAGTCCCCAG
121 GCTCCCAGC AGGCAGAAGT ATGCAAAGCA TGCATCTCAA TTAGTCAGCA ACCAGGTGTG
181 GAAAGTCCCC AGGCTCCCCA GCAGGCAGAA GTATGCAAAG CATGCATCTC AATTAGTCAG
241 CAACCATAGT CCCGCCCTA ACTCCGCCCA TCCCGCCCT AACTCCGCC AGTTCGCCCC
301 ATTCTCGCC CCATGGCTGA CTAATTTTTT TTATTTATGC AGAGGCCGAG GCCGCCTCGG
361 CCTCTGAGCT ATTCCAGAAG TAGTGAGGAG GCTTTTTTGG AGGCCTAGGC TTTTGCAAAA
421 AGCTTGATTC TTCTGACACA ACAGTCTCGA ACTTAAGCTG CAGAAGTTGG TCGTGAGGCA
481 CTGGGCAGGT AAGTATCAAG GTTACAAGAC AGGTTTAAGG AGACCAATAG AAAGTGGGCT
541 TGTGAGACA GAGAAGACTC TTGCGTTTCT GATAGGCACC TATTGGTCTT ACTGACATCC
601 ACTTTGCCTT TCTCTCCACA GGTGTCCACT CCCAGTTCAA TTACAGCTCT TAAGGCTAGA
661 GACTTAATA CGACTCACTA TAGATATCGC TAGCACTAGT TAAACGAAT TCAGAGCTCG
721 TCGACGGCGC GCCGTATACA CGTGCATCCG GTTATGTAAC CAATCCGGAA GCGACCAACG
781 CCTTGATTGA CAAGGATGGA TGGCTACATT CTGGAGACAT AGCTTACTGG GACGAAGACG
841 AACACTTCTT CATCGTTGAC CGCCTGAAGT CTCTGATTAA GTACAAAGGC TATCAGGTGG
901 CTCCCCTGTA ATTGGAATCC ATCTTGCTCC AACACCCCAA CATCAGAGAC GCAGGTGTCC
961 CAGTCTTCC CGACGATGAC GCCGGTGAAC TTCCGCCCGC CGTTGTTGTT TTGGAGCAGC
1021 GAAAGACGAT GACGGAAAAA GAGATCGTGG ATTACGTGCG CAGTCAAGTA ACAACCGCGA
1081 AAAAGTTGCG CGGAGGAGTT GTGTTTGTGG ACGAAGTACC GAAAGGTCTT ACCGGAAAAA
1141 GAGACGCAAG AAAAATCAGA GAGATCCTCA TAAAGGCCAA GAAGGGCGGA AAGATCGCCG
1201 TGTAATCTAG AGCGGCCGCT TCGAGCAGAC ATGATAAGAT ACATTGATGA GTTTGGACAA

```

1261 ACCACAAC TA GAATGCAGTG AAAAAAATGC TTTATTTGTG AAATTTGTGA TGCTATTGCT
1321 TTATTTGTAA CCATTATAAG CTGCAATAAA CAAGTTAACA ACAACAATTG CATTCAATTT
1381 ATGTTTCAGG TTCAGGGGGA GGTGTGGGAG GTTTTTTAAA GCAAGTAAA CCTCTACAAA
1441 TGTGGTAAAA TCGATAAGGA TCCAGGTGGC ACTTTTCGGG GAAATGTGCG CGGAACCCCT
1501 ATTTGTTTAT TTTTCTAAAT ACATTCAAAT ATGTATCCGC TCATGAGACA ATAACCCTGA
1561 TAAATGCTTC AATAATATTG AAAAAGGAAG AGTATGAGTA TTCAACATTT CCGTGTCCGC
1621 CTTATTCCCT TTTTTCGGGC ATTTTGCCTT CCTGTTTTTG CTCACCCAGA AACGCTGGTG
1681 AAAGTAAAG ATGCTGAAGA TCAGTTGGGT GCACGAGTGG GTTACATCGA ACTGGATCTC
1741 AACAGCGGTA AGATCCTTGA GAGTTTTCGC CCCGAAGAAC GTTTTCCAAT GATGAGCACT
1801 TTTAAAGTTC TGCTATGTGG CGCGGTATTA TCCCGTATTG ACGCCGGGCA AGAGCAACTC
1861 GGTCCGCCGA TACACTATTC TCAGAATGAC TTGGTTGAGT ACTCACCAGT CACAGAAAAG
1921 CATCTTACGG ATGGCATGAC AGTAAGAGAA TTATGCAGTG CTGCCATAAC CATGAGTGAT
1981 AACACTGCGG CCAACTTACT TCTGACAACG ATCGGAGGAC CGAAGGAGCT AACCGCTTTT
2041 TTGCACAACA TGGGGGATCA TGTAACCTCGC CTTGATCGTT GGGAAACCGGA GCTGAATGAA
2101 GCCATACCAA ACGACGAGCG TGACACCAGG ATGCCTGTAG CAATGGCAAC AACGTTGGCG
2161 AAATAATTA CTGGCGAACT ACTTACTCTA GCTTCCCGC AACAATTAAT AGACTGGATG
2221 GAGGCGGATA AAGTTGCAGG ACCACTTCTG CGCTCGGCC TTCCGGCTGG CTGGTTTATT
2281 GCTGATAAAT CTGGAGCCGG TGAGCGTGGG TCTCGCGGTA TCATTGCAGC ACTGGGGCCA
2341 GATGGTAAGC CCTCCCGTAT CGTAGTTATC TACAGGACGG GGAGTCAGGC AACTATGGAT
2401 GAACGAAATA GACAGATCGC TGAGATAGGT GCCTACTGA TTAAGCATTG GTAAGTGTCA
2461 GACCAAGTTT ACTCATATAT ACTTTAGATT GATTTAAAAC TTCATTTTTA ATTTAAAAGG
2521 ATCTAGGTGA AGATCCTTTT TGATAATCTC ATGACCAAAA TCCCTTAACG TGAGTTTTCG
2581 TTCCACTGAG CGTCAGACCC CGTAGAAAAG ATCAAAGGAT CTTCTTGAGA TCCTTTTTTT
2641 CTGCGCGTAA TCTGCTGCTT GCAAACAAAA AAACCACCGC TACCAGCGGT GGTGTTGTTG
2701 CCGGATCAAG AGCTACCAAC TCTTTTCCG AAGGTAAGT GCTTCAGCAG AGCGCAGATA
2761 CCAAATACTG TTCTTCTAGT GTAGCCGTAG TTAGGCCACC ACTTCAAGAA CTCTGTAGCA
2821 CCGCTACAT ACCTCGCTCT GCTAATCCTG TTACCAGTGG CTGCTGCCAG TGGCGATAAG
2881 TCGTGTCTTA CCGGGTTGGA CTCAAGACGA TAGTTACCGG ATAAGGCGCA GCGGTCCGGC
2941 TGAACGGGGG GTTCGTGCAC ACAGCCCAGC TTGGAGCGAA CGACCTACAC CGAACTGAGA
3001 TACCTACAGC GTGAGCTATG AGAAAGCGCC ACGCTTCCCG AAGGGAGAAA GCGCGACAGG
3061 TATCCGGTAA GCGGCAGGGT CGGAACAGGA GAGCGCACGA GGGAGCTTCC AGGGGAAAC
3121 GCCTGGTATC TTTATAGTCC TGTCGGGTTT CGCCACCTCT GACTTGAGCG TCGATTTTTG
3181 TGATGCTCGT CAGGGGGGCG GAGCCTATGG AAAACGCCA GCAACGCGGC CTTTTACGG
3241 TTCCTGGCCT TTTGCTGGCC TTTTGCTCAC ATGGCTCGAC

<C Protein Control Vector>



| | |
|----------------------------------|-----------|
| SV40 early enhancer/promoter | 7-425 |
| chimeric intron | 462-684 |
| T7 promoter / priming site | 666-683 |
| Secretory protein | 695-1855 |
| Multiple cloning site | 1856-1881 |
| C Protein gene | 1889-2347 |
| SV40 late polyadenylation signal | 2366-2589 |
| Ampicillin resistance gene | 2736-3595 |

C Protein Control Vector 配列

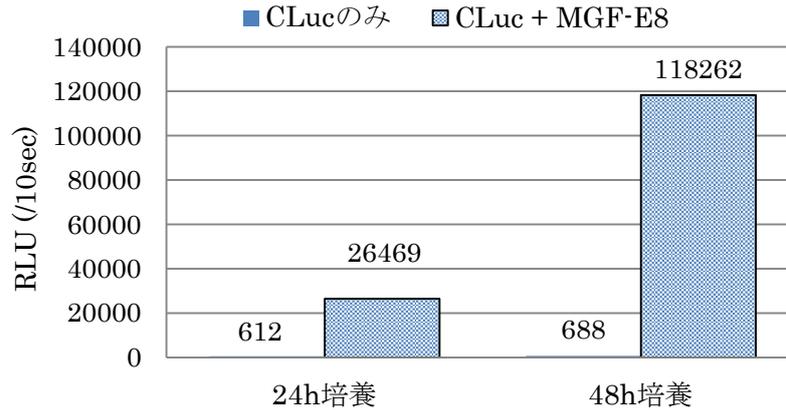
```

1 AGATCTGCGC AGCACCATGG CCTGAAATAA CCTCTGAAAG AGGAACTTGG TTAGGTACCT
61 TCTGAGGCGG AAAGAACCAG CTGTGGAATG TGTGTCAGTT AGGGTGTGGA AAGTCCCCAG
121 GCTCCCAGC AGGCAGAAGT ATGCAAAGCA TGCATCTCAA TTAGTCAGCA ACCAGGTGTG
181 GAAAGTCCCC AGGCTCCCCA GCAGGCAGAA GTATGCAAAG CATGCATCTC AATTAGTCAG
241 CAACCATAGT CCCGCCCTA ACTCCGCCA TCCCGCCCT AACTCCGCC AGTTCGCCCC
301 ATTCTCCGCC CCATGGCTGA CTAATTTTTT TTATTTATGC AGAGGCCGAG GCCGCCTCGG
361 CCTCTGAGCT ATTCCAGAAG TAGTGAGGAG GCTTTTTTGG AGGCCTAGGC TTTTGCAAAA
421 AGCTTGATTC TTCTGACACA ACAGTCTCGA ACTTAAGCTG CAGAAGTTGG TCGTGAGGCA
481 CTGGGCAGGT AAGTATCAAG GTTACAAGAC AGGTTTAAGG AGACCAATAG AACTGGGCT
541 TGTGAGACA GAGAAGACTC TTGCGTTTCT GATAGGCACC TATTGGTCTT ACTGACATCC
601 ACTTTGCCTT TCTCTCCACA GGTGTCCACT CCCAGTTCAA TTACAGCTCT TAAGGCTAGA
661 GACTTAATA CGACTCACTA TAGATATCGC TAGCATGCCG CGCCCCGCC TGCTGGCCGC
721 GCTGTGCGGC GCGCTGCTCT GCGCCCCAG CCTCCTCGTC GCCCTGGATA TCTGTTCCAA
781 AAACCCTGC CACAACGGTG GTTATGCGA GGAGATTTCC CAAGAAGTGC GAGGAGATGT
841 CTCCCTCG TACACCTGCA CGTGCCTTAA GGGCTACGCG GGCAACCACT GTGAGACGAA
901 ATGTGTCGAG CCACTGGGCC TGGAGAATGG GAACATTGCC AACTCACAGA TCGCCGCCCTC
961 GTCTGTGCGT GTGACCTTCT TGGTTTTGCA GCATTGGGTC CCGGAGCTGG CCCGCCTGAA
1021 CCGGCAGGC ATGGTCAATG CCTGGACACC CAGCAGCAAT GACGATAACC CCTGGATCCA
1081 GGTGAACCTG CTGCGGAGGA TGTGGGTAAC AGGTGTGGTG ACGCAGGGTG CCAGCCGCTT
1141 GGCCAGTCAT GAGTACCTGA AGGCCTTCAA GGTGGCCTAC AGCCTTAATG GACACGAATT
  
```

1201 CGATTCATC CATGATGTTA ATAAAAACA CAAGGAGTTT GTGGGTAAC TGAACAAAA
1261 CGCGGTGCAT GTCAACCTGT TTGAGACCCC TGTGGAGGCT CAGTACGTGA GATTGTACCC
1321 CACGAGCTGC CACACGGCCT GCACTCTGCG CTTTGAGCTA CTGGGCTGTG AGCTGAACGG
1381 ATGGGCCAAT CCCCTGGGCC TGAAGAATAA CAGCATCCCT GACAAGCAGA TCACGGCCTC
1441 CAGCAGCTAC AAGACCTGGG GCTTGCATCT CTTGAGCTGG AACCCCTCCT ATGCACGGCT
1501 GGACAAGCAG GGCAACTTCA ACGCCTGGGT TGGGGGAGC TACGGTAACG ATCAGTGGCT
1561 GCAGGTGGAC CTGGGCTCCT CGAAGGAGGT GACAGGCATC ATCACCAGG GGGCCCCTAA
1621 CTTTGGCTCT GTCCAGTTTG TGGCATCCTA CAAGGTTGCC TACAGTAATG ACAGTGGCAA
1681 CTGGACTGAG TACCAGGACC CCAGGACTGG CAGCAGTAAG ATCTTCCCTG GCAACTGGGA
1741 CAACCACTCC CACAAGAAGA ACTTGTGTTG GACGCCATC CTGGCTCGCT ATGTGCGCAT
1801 CCTGCCTGTA GCCTGGCACA ACCGCATCGC CCTGCGCCTG GAGCTGCTGG GCTGTGAGCT
1861 CGTCGACGGC GCGCCGTATA CACGTGCATC CGGTTATGTA AACAATCCGG AAGCGACCAA
1921 CGCCTTGATT GACAAGGATG GATGGCTACA TTCTGGAGAC ATAGCTTACT GGGACGAAGA
1981 CGAACACTTC TTCATCGTTG ACCGCCTGAA GTCTCTGATT AAGTACAAAG GCTATCAGGT
2041 GGCTCCGCT GAATTGGAAT CCATCTTGCT CCAACACCCC AACATCAGAG ACGCAGGTGT
2101 CGCAGGTCTT CCCGACGATG ACGCCGGTGA ACTTCCGCGC GCCGTTGTTG TTTTGGAGCA
2161 CGGAAAGACG ATGACGGAAA AAGAGATCGT GGATTACGTC GCCAGTCAAG TAACAACCGC
2221 GAAAAAGTTG CGCGGAGGAG TTGTGTTTGT GGACGAAGTA CCGAAAGGTC TTACCGGAAA
2281 AAGAGACGCA AGAAAAATCA GAGAGATCCT CATAAAGGCC AAGAAGGGCG GAAAGATCGC
2341 CGTGTAACT AGAGCGGCCG CTTGAGCAG ACATGATAAG ATACATTGAT GAGTTTGGAC
2401 AAACCACAAC TAGAATGCAG TGAAAAAAT GCTTTATTTG TGAATTTGT GATGCTATTG
2461 CTTTATTTGT AACCAATATA AGCTGCAATA AACAAGTTAA CAACAACAAT TGCATTCATT
2521 TTATGTTTCA GGTTCCAGGGG GAGGTGTGGG AGGTTTTTTA AAGCAAGTAA AACCTCTACA
2581 AATGTGGTAA AATCGATAAG GATCCAGGTG GCACTTTTCG GGGAAATGTG CGCGGAACCC
2641 CTATTTGTTT ATTTTCTAA ATACATTCAA ATATGTATCC GCTCATGAGA CAATAACCCCT
2701 GATAAATGCT TCAATAATAT TGAAAAAGGA AGAGTATGAG TATTCAACAT TTCCGTGTCC
2761 CCCTTATTC CTTTTTTCG GCATTTTGCC TTCCTGTTTT TGCTCACCCA GAAACGCTGG
2821 TGAAAGTAAA AGATGCTGAA GATCAGTTGG GTGCACGAGT GGGTTACATC GAACTGGATC
2881 TCAACAGCGG TAAGATCCTT GAGAGTTTTT GCCCGAAGA ACGTTTTCCA ATGATGAGCA
2941 CTTTTAAAGT TCTGCTATGT GCGCGGTAT TATCCCGTAT TGACGCCGGG CAAGAGCAAC
3001 TCGGTCGCCG CATACTAT TCTCAGAATG ACTTGTTGA GTACTACCA GTCACAGAAA
3061 AGCATCTTAC GGATGGCATG ACAGTAAGAG AATTATGCAG TGCTGCCATA ACCATGAGTG
3121 ATAACACTGC GGCCAACTTA CTTCTGACAA CGATCGGAGG ACCGAAGGAG CTAACCGCTT
3181 TTTTGACAAA CATGGGGGAT CATGTAATC GCCTTGATCG TTGGGAACCG GAGCTGAATG
3241 AAGCCATACC AAACGACGAG CGTGACACCA CGATGCCTGT AGCAATGGCA ACAACGTTGC
3301 GCAAACCTAT AACTGGCGAA CTACTTACTC TAGCTTCCCG GCAACAATTA ATAGACTGGA
3361 TGGAGGCGGA TAAAGTTGCA GGACCACTTC TGGCTCGGC CTTCCGGCT GGCTGGTTTA
3421 TTGCTGATAA ATCTGGAGCC GGTGAGCGTG GGTCTCGCGG TATCATTGCA GCACTGGGGC
3481 CAGATGGTAA GCCCTCCCGT ATCGTAGTTA TCTACACGAC GGGGAGTCAG GCAACTATGG
3541 ATGAACGAAA TAGACAGATC GCTGAGATAG GTGCCTCACT GATTAAGCAT TGGTAACTGT
3601 CAGACCAAGT TTAATCATAT ATACTTTAGA TTGATTTAAA ACTTCATTTT TAATTTAAAA
3661 GGATCTAGGT GAAGATCCTT TTTGATAATC TCATGACCAA AATCCCTTAA CGTGAGTTTT
3721 CGTTCCTACTG AGCGTCAGAC CCCGTAGAAA AGATCAAAGG ATCTTCTTGA GATCCTTTTT
3781 TTCTGCGCGT AATCTGCTGC TTGCAAACAA AAAAACCACC GCTACCAGCG GTGGTTTGT
3841 TGCCGGATCA AGAGCTACCA ACTCTTTTTT CGAAGGTAAC TGGCTTCAGC AGAGCGCAGA
3901 TACCAAATAC TGTTCTTCTA GTGTAGCCGT AGTTAGGCCA CCACTTCAAG AACTCTGTAG
3961 CACCGCCTAC ATACCTCGCT CTGCTAATCC TGTTACCAGT GGCTGCTGCC AGTGGCGATA
4021 AGTCGTGTCT TACCGGGTTG GACTCAAGAC GATAGTTACC GGATAAGGCG CAGCGGTCCG
4081 GCTGAACGGG GGGTTCGTGC ACACAGCCCA GCTTGGAGCG AACGACCTAC ACCGAACTGA
4141 GATACCTACA GCGTGAGCTA TGAGAAAGCG CCACGCTTCC CGAAGGGAGA AAGGCGGACA
4201 GGTATCCGGT AAGCGGCAGG GTCGGAACAG GAGAGCGCAC GAGGGAGCTT CCAGGGGGAA
4261 ACGCCTGGTA TCTTTATAGT CCTGTCCGGT TTCGCCACCT CTGACTTGAG CGTCGATTTT
4321 TGTGATGCTC GTCAGGGGGG CGGAGCCTAT GGAAAAACGC CAGCAACGCG GCCTTTTTAC
4381 GGTTCCTGGC CTTTTGCTGG CTTTTGCTC ACATGGCTCG AC

V. 解析例

【解析例 I】 分泌タンパク質の細胞外(培地中)への移行解析①

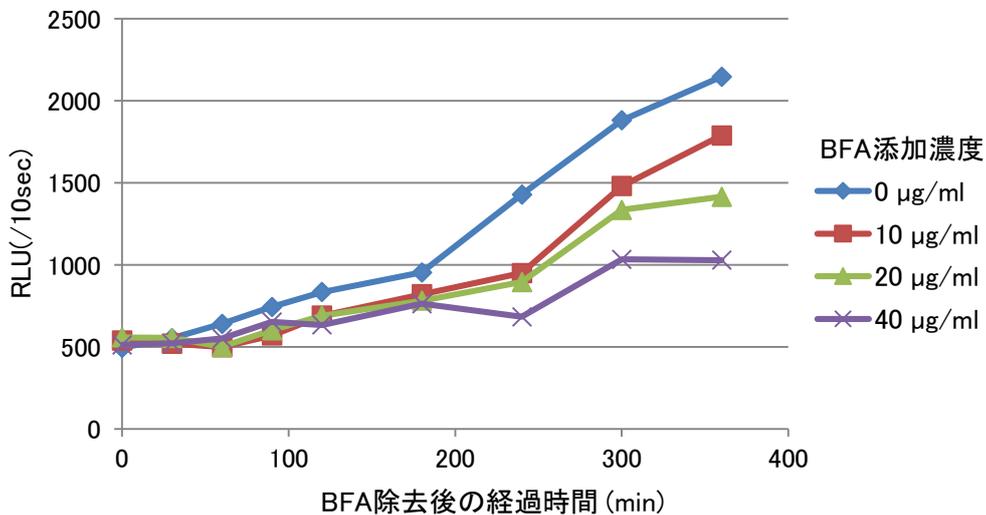


CHO 細胞を 24 ウェルプレートに播種し、“C Protein のみを発現するように開始コドンのみを挿入した C Protein Test Vector +ATG (CLuc のみ)”または“分泌タンパク質 (Milk Growth Factor-E8) と C Protein の融合タンパク質を発現する C Protein Control Vector (CLuc + MGF-E8)”をトランスフェクションした。

24 時間または 48 時間培養後、培地を回収し、N Protein 試薬 (希釈済) を添加してルシフェラーゼを再構成させた後、RS 発光試薬 (調製済) を加え、発光量を測定した。

⇒コントロールベクターを導入した細胞の培養上清中には、MGF-E8 と C Protein の融合タンパク質が分泌されたため、発光を確認できた (グラフ: MGF-E8)。

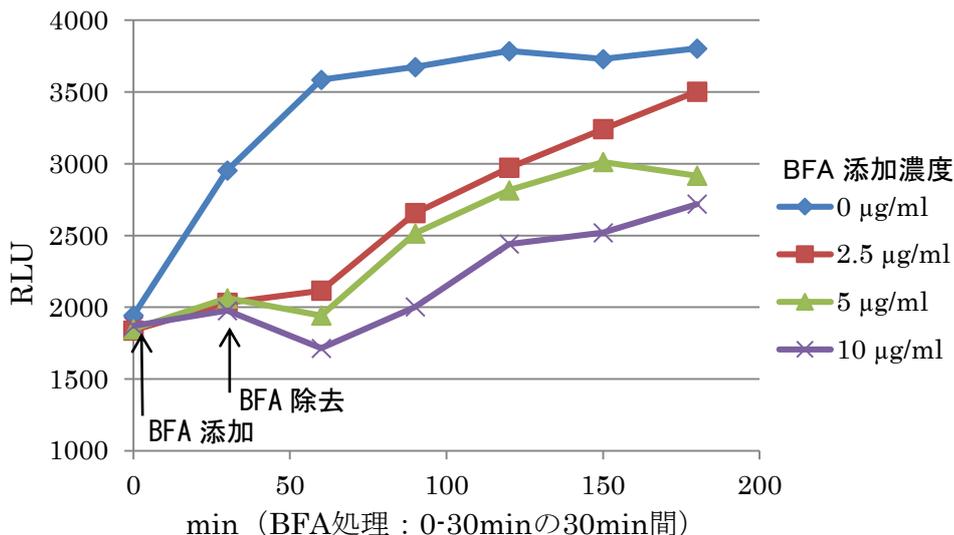
【解析例 II】 分泌タンパク質の細胞外(培地中)への移行解析② ~ 阻害剤による影響 ~



CHO 細胞を 24 ウェルプレートに播種し、“分泌タンパク質 (Milk Growth Factor-E8) と C Protein の融合タンパク質を発現する C Protein Control Vector (MGF-E8: 融合タンパク質あり)”をトランスフェクションした。24 時間培養後、培地を除去し、Brefeldin A (BFA) を添加した培地に交換した。1 時間後に BFA 入りの培地を除去し、PBS でウェル内を洗浄した後、BFA を含まない新しい培地に再交換した。培地交換から一定時間後に培地を回収し、N Protein 試薬 (希釈済) を添加してルシフェラーゼを再構成させた後、RS 発光試薬 (調製済) を加え、発光量を測定した。

⇒BFA 処理による細胞外への分泌阻害が確認できた。また、阻害からの回復時間は、BFA 濃度に比例していることが分かる。

【解析例Ⅲ】 タンパク質の細胞膜表面への移行解析 ～阻害剤による影響～



CHO 細胞を 10cm dish に播種し、pDisplay Vector (Sigma 社) に C Protein を導入したプラスミド (pDisplay-C Protein) をトランスフェクションした。24 時間培養後、トリプシン-EDTA で細胞をはがして回収した。回収した細胞を各濃度の Brefeldin A (BFA) で 30 分間処理し、BFA を含まない新しい培地に再交換した。一定時間毎に細胞を回収し、N Protein 試薬 (希釈済) を添加してルシフェラーゼを再構成させた後、RS 発光試薬 (調製済) を加え、発光量を測定した。

⇒BFA 処理による細胞表面への移行阻害が確認できた。また、阻害からの回復時間は、BFA 濃度に比例していることが分かる。

~~~~~  
 ※本解析では、細胞を剥がす際にトリプシン-EDTA を使用しているため、回収直後の細胞では細胞膜表面上の C Protein は分解されている。BFA 処理後の経過時間中に発現した C Protein 量を発光量として確認している。

## VI. トラブルシューティング

| 問題                           | 原因                               | 解決法                                                                                                                               |
|------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 発光しない。<br>発光量が低い。            | C Protein が発現していない。または、発現量が不十分。  | <ul style="list-style-type: none"> <li>● ご使用のトランスフェクション試薬とその使用方法を確認して下さい。</li> <li>● 細胞種、導入遺伝子に合わせて培養条件を最適化して下さい。</li> </ul>      |
|                              | 黒色プレートを使用している。                   | ● 黒色プレートは発光を吸収するため、検出される発光量が低くなります。発現量が低い場合は、白色プレートの使用を推奨します。                                                                     |
|                              | 試薬が劣化している。                       | ● 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、4 ページ参照)。また、N protein 試薬(希釈済)、RS 発光試薬(調製済)の性能確認を行って下さい(4 ページ参照)。                |
|                              | RS 発光試薬(調製済)が室温に戻っていない。          | ● 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。RS 発光試薬(調製済)を添加する前に、RS 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。          | ● 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。 | 測定機器で設定した測定時間(積算時間)が長い。          | ● 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。                                                                                                   |
|                              | 細胞数が多い。                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>● 播種数や培養時間を減らして下さい。</li> <li>● または、N Protein 試薬(希釈済)と反応させる前の細胞懸濁液の細胞密度を下げてください。</li> </ul> |
| 測定値のばらつきが大きい。                | 細胞数が多い。                          | ● オーバーコンフルエントで培養を行った場合、細胞数のばらつきにより正しく測定されない可能性があります。播種数を減らして下さい。                                                                  |
|                              | 細胞数が少ない。または、発現量が低すぎる。            | ● 細胞数が少なく、発現量が低すぎる場合は、値が低いためにばらつきが大きくなります。培養時の最適条件を検討して下さい。                                                                       |
|                              | C Protein と N Protein の会合時間が異なる。 | ● N Protein 試薬(希釈済)の添加から RS 発光試薬(調製済)の添加までの時間を一定にして下さい。                                                                           |
|                              | 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。       | ● RS 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。             | ● 融解後の試薬は十分に攪拌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、ボトルの反転やピペティング等により穏やかに攪拌して下さい。                                                  |



## VII. 使用上の注意

- ご購入時に同意された購入同意書の内容を遵守して下さい。
- 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>