

ReStart LUC[®] QT Kit (RS-QT)

取扱説明書

I. 概要図	2
II. 製品構成および試薬準備	2
III. 実施例	4
IV. ベクターマップ・配列	8
V. トラブルシューティング	10
VI. 使用上の注意	11

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. 概要図

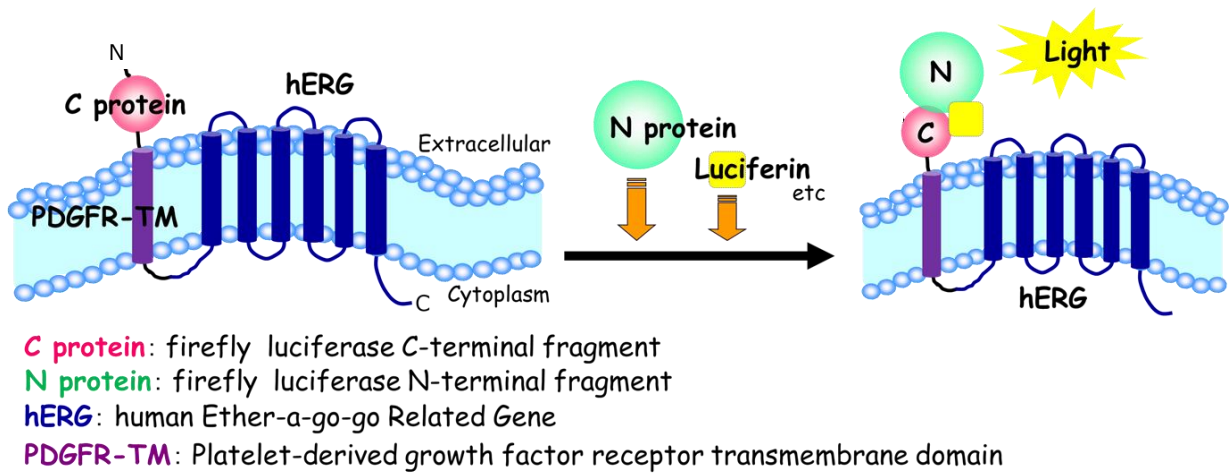


図 1. 薬剤誘発性 QT 延長リスクの評価コンセプト(例)

II. 製品構成および試薬準備

		製品			
		ReStart LUC [®] QT Kit	ReStart LUC [®] assay Kit		
		100 回用 (RS-QT100)	100 回用 (RS-A100)	500 回用 (RS-A500)	1000 回用 (RS-A1000)
構成 品	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 Test Vector (0.5 μg/μl, 20 μl)	1 本	—	—	—

試薬準備	
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℃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℃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、ピペッ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のため、必要量ずつ小分けにして-80℃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 μl を発光測定用チューブに入れ、細胞培養用培地(又は PBS) 100 μl を添加します。
- 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 の場合は 10 分間)静置します。
- RS 発光試薬(調製済) 100 μl 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。

Ⅲ. 実施例「薬剤誘発性 QT 延長リスクの評価」

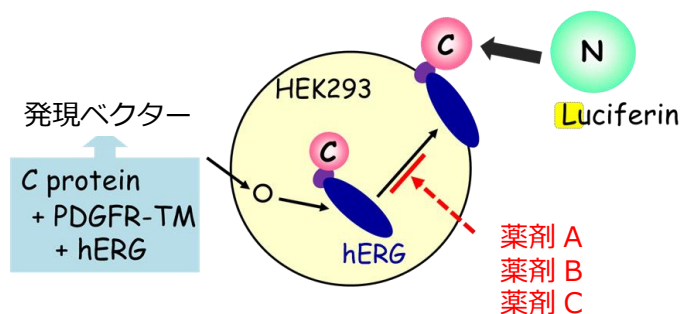


図 2. 薬剤により誘発された hERG 膜輸送阻害の検出例(概要図)

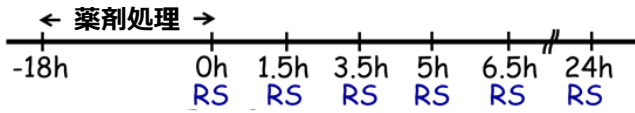
- ① 「ルシフェラーゼ レポータータンパク質の C 末端側断片 (C Protein)」、「PDGFR 膜貫通領域 (PDGFR-TM)」、「hERG チャンネル」の融合タンパク質を HEK293 細胞に発現させる
- ② hERG の膜輸送を阻害することが報告されている薬剤で処理 (薬剤 A、薬剤 B、薬剤 C)
- ③ 「ルシフェラーゼの N 末端側断片 (N Protein)」を添加し、細胞膜上でルシフェラーゼを再構成させる
- ④ 発光基質ルシフェリン (発光試薬) を添加し、発光量 (RLU) を測定する
- ⑤ 薬剤未処理時の RLU との比較 (発光阻害率の算出) により、hERG 膜輸送阻害を評価する

<測定例> 安定発現株を作製する場合

①	クローニング	<ol style="list-style-type: none"> 1. C Protein、PDGFR-TM、hERG チャンネルをコードする遺伝子を発現ベクター (例 Thermo Fisher Scientific 社 pcDNA3.1(-) etc.) にクローニングします。 <ul style="list-style-type: none"> ☞ C Protein が細胞表面上に出るように遺伝子を配列します。 ☞ HA-tag など、他のタグを追加して挿入することも可能です。
②	安定発現株の作製	<ol style="list-style-type: none"> 2. ステップ 1. で作製した発現用プラスミドを細胞 (HEK293 細胞 etc.) にトランスフェクションし、C Protein、PDGFR-TM、hERG の融合タンパク質を発現させます。 3. 薬剤選択により、安定発現株を作製します。
③-1	細胞播種	<ol style="list-style-type: none"> 4. 薬剤処理の前日に、ウェルプレートまたはディッシュに細胞を播種します。 <ul style="list-style-type: none"> ☞ ステップ③-4 の時点 (薬剤処理後) で、細胞がオーバーグロースの状態にならないよう、細胞播種数を調整します。
③-2	薬剤処理 (評価物質の添加)	<ol style="list-style-type: none"> 5. 前日に播種した細胞に、評価対象となる薬剤を添加し、一定時間培養して薬剤処理を行います。 <ul style="list-style-type: none"> ☞ コントロールとして、薬剤無添加の細胞も準備します。

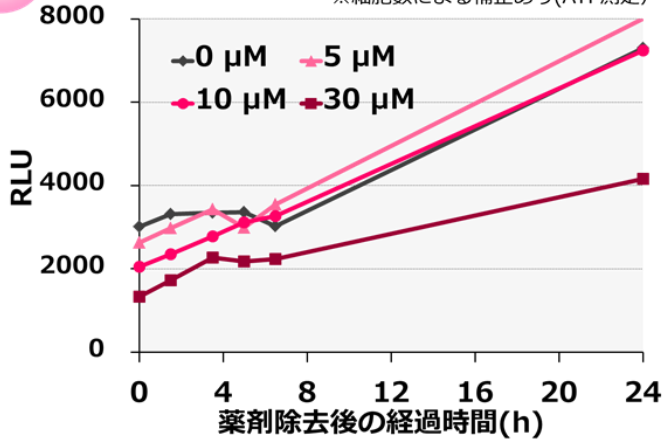
③-3	サンプル (細胞)回収	<p>6. スクレイパーまたはピペッティングにより、薬剤処理した細胞をチューブ等に回収します。</p> <ul style="list-style-type: none"> ☞細胞を剥離する際、トリプシン-EDTA などのタンパク質を分解する酵素の使用は避けて下さい。トリプシンにより、発現したタンパク質が分解され、ルシフェラーゼの再構成が行われなくなります。 ☞hERG チャンネル膜輸送阻害からの回復度を評価したい場合は、本ステップの前に、培地交換により薬剤を除去し、一定時間再培養します。その後、本ステップ同様に細胞を回収します。 <p>7. 回収した細胞懸濁液を 100 μl\sim1.5 ml ずつチューブ等に分注します。</p> <ul style="list-style-type: none"> ☞分注量は、融合タンパク質の発現量により調整して下さい。発現量が低い場合は液量を多くし、発現量が高い場合は、液量を少なくできます。 ☞分注前に、ピペッティングにより細胞をバラバラの状態にしておきます。 ☞残った細胞懸濁液を用いて、ATP 測定による細胞数アッセイを行うことができます(細胞数による補正が可能) <p style="text-align: center;">※推奨試薬:細胞の ATP 測定試薬 Ver2 (コード:CA2)</p> <p>8. 遠心分離(ex 3,000rpm 3min)後、上清(培地)を除去します。</p> <p>9. 20 μl の PBS 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。</p>
③-4	ルシフェラーゼの再構成	<p>10. 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 30 分間、静置します。</p> <ul style="list-style-type: none"> ☞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③-5 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。
③-5	発光測定	<p>11. 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> <ul style="list-style-type: none"> ☞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>ex)発光試薬の添加から 5 秒後に測定を開始する</p>

薬剤 A

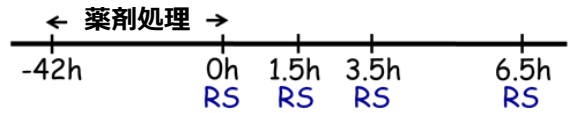


RS RSによる細胞膜上hERGの測定

※細胞数による補正あり(ATP測定)

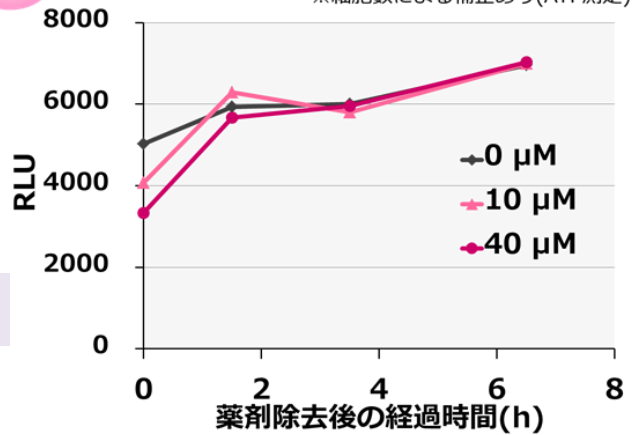


薬剤 B

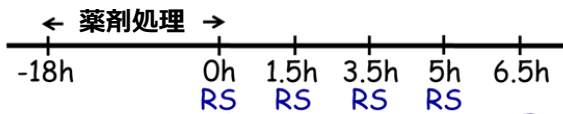


RS RSによる細胞膜上hERGの測定

※細胞数による補正あり(ATP測定)

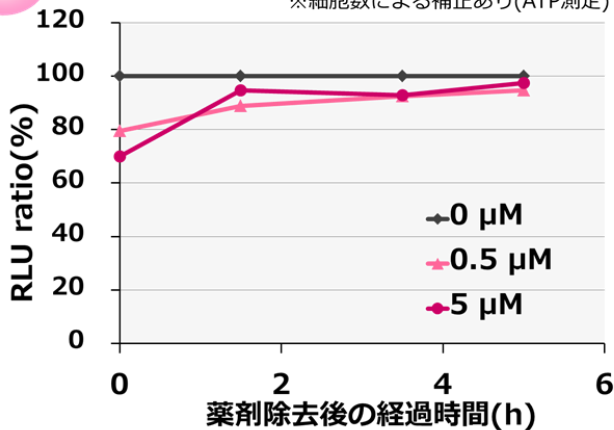


薬剤 C



RS RSによる細胞膜上hERGの測定

※細胞数による補正あり(ATP測定)

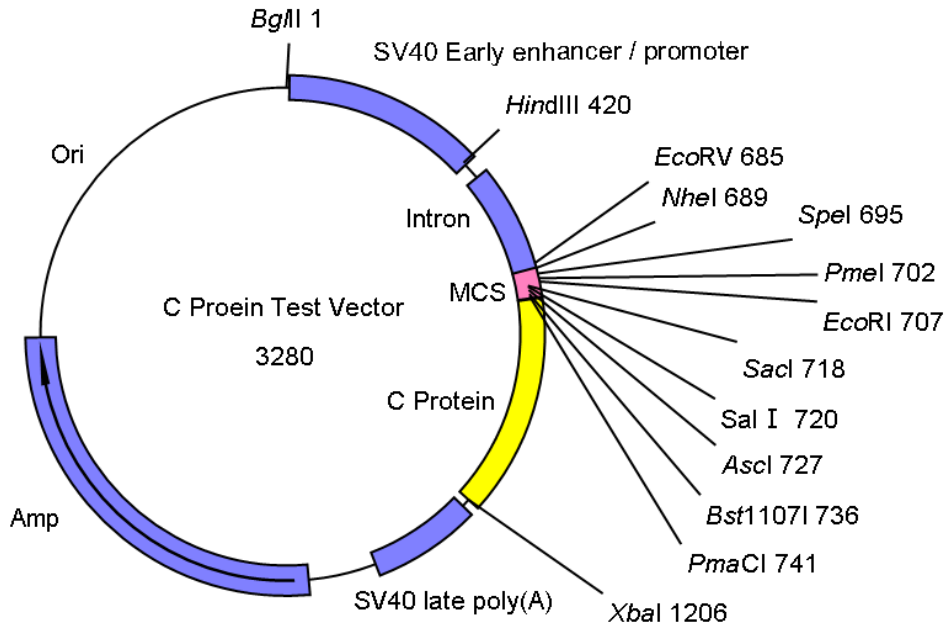


<測定例> 一過性発現の場合

①	クローニング	<p>1. C Protein、PDGFR-TM、hERG チャネルをコードする遺伝子を発現ベクター(例 Thermo Fisher Scientific 社 pcDNA3.1(-) etc.)にクローニングします。</p> <ul style="list-style-type: none"> ☞C Protein が細胞表面上に出るように遺伝子を配列します。 ☞HA-tag など、他のタグを追加して挿入することも可能です。
②	細胞播種	<p>2. トランスフェクションの前日に、ウェルプレートに細胞を播種します。</p> <ul style="list-style-type: none"> ☞ステップ⑤の時点(薬剤処理後)で、細胞がオーバークロースの状態にならないよう、細胞播種数を調整します。
③	融合タンパク質の発現	<p>3. ステップ 1.で作製した発現用プラスミドを細胞(HEK293 細胞 etc)にトランスフェクションし、C Protein、PDGFR-TM、hERG の融合タンパク質を発現させます。</p>
④	薬剤処理	<p>4. 評価対象となる薬剤を添加した培地に交換し、一定時間培養して薬剤処理を行います。</p> <ul style="list-style-type: none"> ☞コントロールとして、薬剤無添加の細胞も準備します。
⑤	サンプル(細胞)回収	<p>5. スクレイパーまたはピペッティングにより、薬剤処理した細胞をチューブ等に回収します。</p> <ul style="list-style-type: none"> ☞細胞を剥離する際、トリプシン-EDTA などのタンパク質を分解する酵素の使用は避けて下さい。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。 ☞<u>hERG チャネル膜輸送阻害からの回復度を評価したい場合は</u>、本ステップの前に、培地交換により薬剤を除去し、一定時間再培養します。その後、本ステップ同様に細胞を回収します。 <p>6. 回収した細胞懸濁液を 100 μl~500 μl ずつチューブ等に分注します。</p> <ul style="list-style-type: none"> ☞分注量は、融合タンパク質の発現量により調整して下さい。発現量が低い場合は液量を多くし、発現量が高い場合は、液量を少なくできます。 ☞分注前に、ピペッティングにより細胞をバラバラの状態にしておきます。 ☞残った細胞懸濁液を用いて、ATP 測定による細胞数アッセイを行うことができます(細胞数による補正が可能) <p style="text-align: center;">※推奨試薬:細胞の ATP 測定試薬 Ver2 (コード:CA2)</p> <p>7. 遠心分離(ex 3,000rpm 3min)後、上清(培地)を除去します。</p> <p>8. 20 μl の PBS 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。</p>
⑥	ルシフェラーゼ再構成 & 発光測定	<p>9. 安定発現株の場合と同様に、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、発光量を測定します。</p> <ul style="list-style-type: none"> ☞詳細は P5(ステップ③-4、③-5)を参照

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 AAGTCCCAG
121 GCTCCCAGC AGGCAGAAGT ATGCAAAGCA TGCATCTCAA TTAGTCAGCA ACCAGGTGTG
181 GAAAGTCCCC AGGCTCCCCA GCAGGCAGAA GTATGCAAAG CATGCATCTC AATTAGTCAG
241 CAACCATAGT CCCGCCCTA ACTCCGCCA TCCCGCCCT AACTCCGCC AGTTCGCC
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 CCCAGTCAA 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 CAGGTCTTCC CGACGATGAC GCCGGTGAAC TTCCCGCCGC 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 TGACACCAGC 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 GCCTCACTGA 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 ACGCTTCCG 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

V. 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。	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"> ● 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。 ● 細胞種に合わせて培養条件を最適化して下さい。
	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。	<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。 ● 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(3 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"> ● 播種数や培養時間を減らして下さい。 ● 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。
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
HP: <https://artiencegroup.com>