

# ReStart LUC<sup>®</sup>

RS-F100、RS-A100、RS-A500、RS-A1000



概要	<p>ルシフェラーゼを切断し、発光能を失活させました。</p> <p>一方の断片を検出タグとして発現させた後、ルシフェラーゼを再構成して発光能を回復させることで、分泌シグナルやタンパク質の細胞内輸送を解析できます。</p>
希望小売価格 (税別)	RS-F100 : 64,160円 RS-A100 : 32,760円 RS-A500 : 109,200円 RS-A1000 : 177,450円
製品構成	RS-F100: 100回用 (ベクターあり) RS-A100: 100回用 RS-A500: 500回用 RS-A1000: 1000回用
保存条件	-80℃、遮光

# ReStart LUC<sup>®</sup> full Kit

## ReStart LUC<sup>®</sup> assay Kit

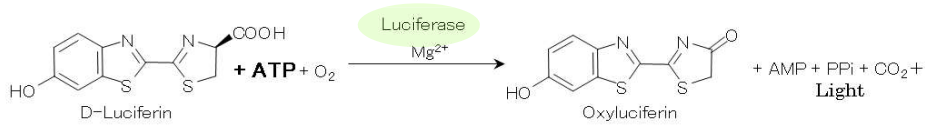
メーカーコード

RS-F100 (※ベクター入り)

RS-A100, RS-A500, RS-A1000

東洋ビーネット株式会社 バイオプロダクツ部

【ホタル・ルシフェラーゼ発光反応機構】



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 (Fig.1、解析例 I・II) や、タンパク質の細胞内小器官移行解析 (Fig.2、解析例 III) に利用できます。

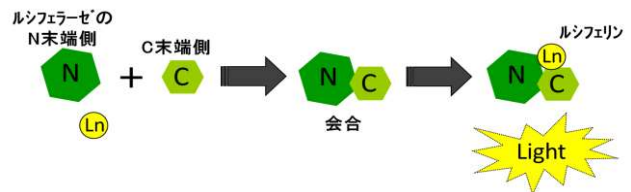


Fig.1 分泌シグナルペプチドの解析方法

- 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。

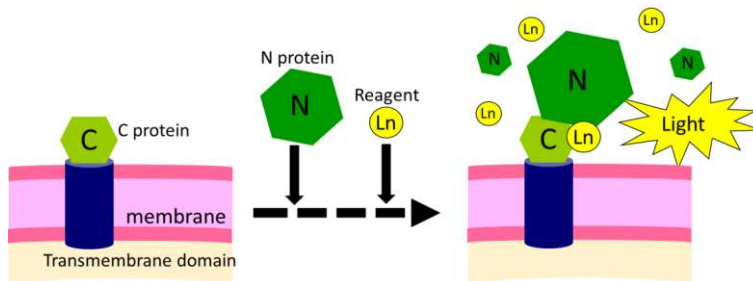
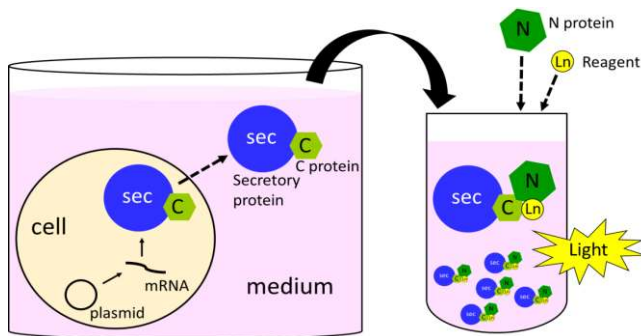


Fig.2 タンパク質の細胞内移行解析方法

- 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。

### ● 解析例 I

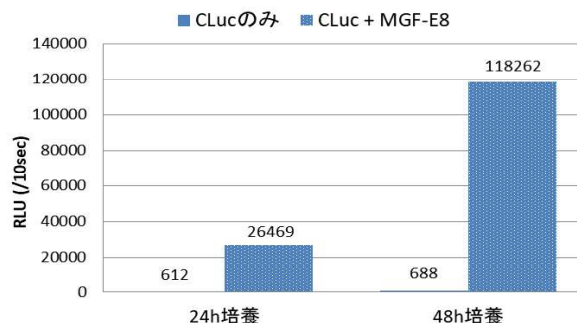


Fig.3 分泌タンパク質の細胞外 (培地中) への移行解析①

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試薬を添加してルシフェラーゼを再構成させた後、発光試薬を加え、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

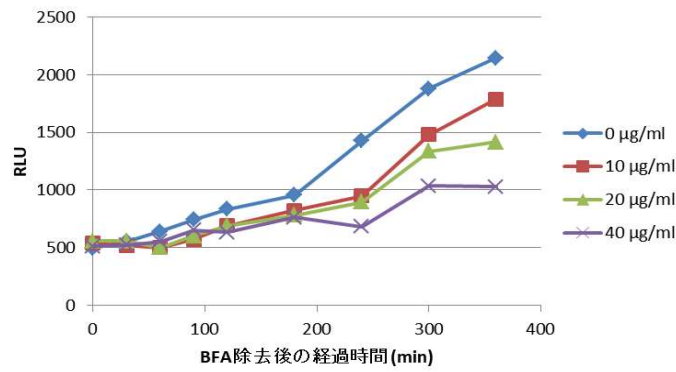


Fig.4 分泌タンパク質の細胞外（培地中）への移行解析② ～阻害剤による影響～

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”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試薬を添加してルシフェラーゼを再構成させた後、発光試薬を加え、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 II

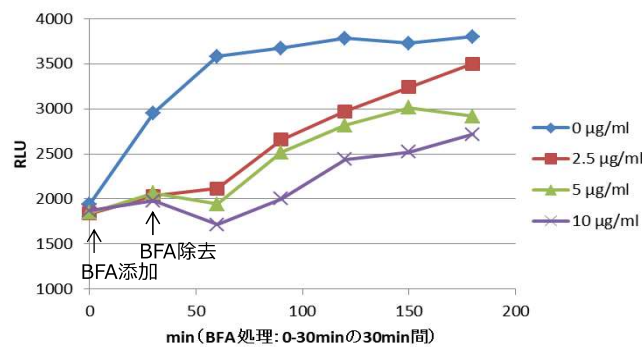


Fig.5 タンパク質の細胞膜表面への移行解析 ～阻害剤による影響～

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試薬を添加してルシフェラーゼを再構成させた後、発光試薬を加え、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。  
 よって、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。  
 ~~~~~

