

CO₂インキュベータ機能付 35mm Dish用ルミノメーター
AB-2550 クロノスDio (Kronos Dio)



Photon Countable Incubator
KronosDio

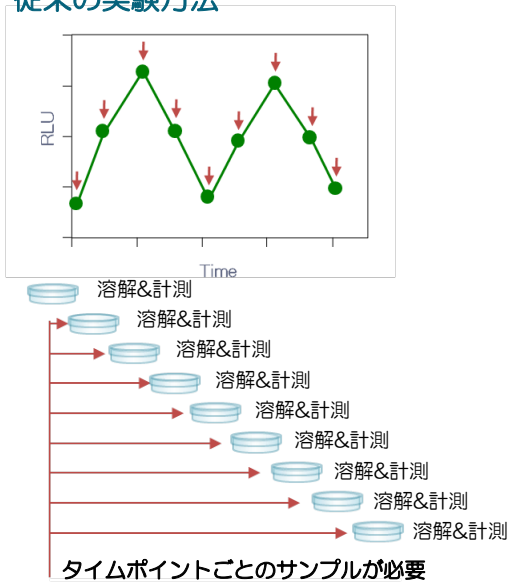
生物発光の長時間モニタリング

クロノス Dio (AB-2550) は光電子増倍管 (PMT) を検出器とする発光計測機器 (ルミノメータ) です。

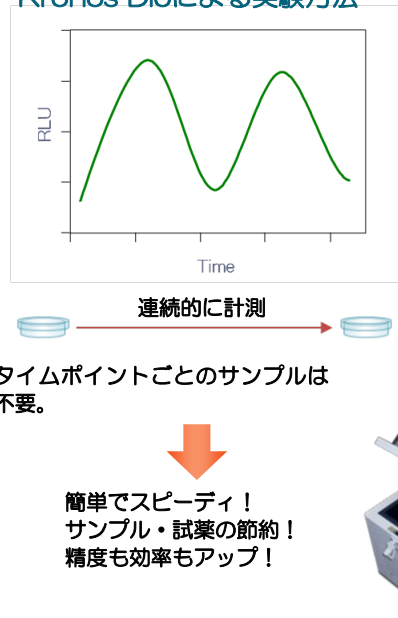
クロノス Dio は庫内の温度と CO₂ ガス濃度をコントロールすることが可能です。また内蔵の光学フィルターを用いた色分離計測ができるため、同時に3色までの発光を計測するマルチカラーアッセイにも対応しております。

培養細胞、組織切片などのサンプルから発せられる微弱な発光を、φ35mm のカルチャーディッシュ上で数時間～数日間にわたって培養しながら、リアルタイムかつ継続的に計測するのに適しております。そのため経時的な発光 (遺伝子発現、細胞増殖等) の変化を追跡するために、タイムポイントごとのサンプルを準備する必要はありません。同一のサンプルで連続的に発光を計測できるため、サンプルを調整・溶解する手間を省くと同時に、サンプル調整時に生じるバラつき、アーティファクトなども最小限に抑えられ、精度と効率のよい実験系を構築できます。

従来の実験方法



Kronos Dioによる実験方法



Kronos Dioはコンパクト (28(W) × 40(D) × 33(H) cm) 設計のため、実験スペースを節約できます (左写真)。

Kronos Dioの内部はCO₂インキュベータのように温度・CO₂ガス・加湿された細胞培養に適した環境です。φ35mmのカルチャーディッシュを8枚までセット可能なサンプルディッシュテーブル (右写真) は、取り外してディッシュの運搬にも使用できます。シャッタークローズ時の計測値をバックグラウンド減算に使用できるため、ネガティブコントロールは不要です。

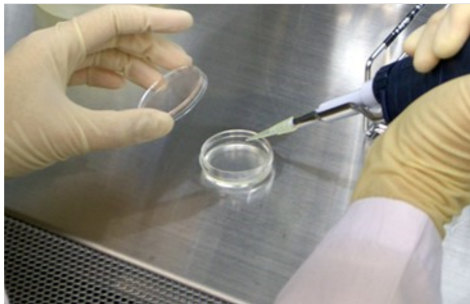
また光学フィルターにより同一サンプルに混在する3色の発光を同時に計測し、色分離係数*をインプットするだけでそれぞれの発光色に相当する発光値が自動的に算出できます。

*色分離係数はそれぞれの発光色のF1/F0、F2/F0の値(透過率)です。

生物発光を3色まで同時に計測

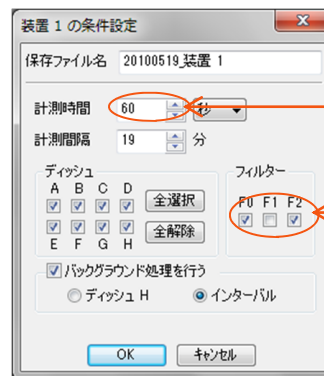
- φ 35mm カルチャーディッシュ上の細胞・組織サンプルを生きたまま計測
- 温度・CO₂濃度コントロール、加湿によるCO₂インキュベータ同様の環境
- ハイスペックPMTによる微弱な生物発光の高感度・高精度検出
- 微弱な生物発光を3色まで同時計測
- ユーザーフレンドリーな設計による簡単な使用方法
- 専用ソフトウェアによるPCからの完全コントロール
- コンパクト設計による省スペース化に成功

シンプルな発光の計測方法



1. 発光試薬の添加

ルシフェリンなどの発光基質を添加します。細胞内に浸透する試薬をお使いください。



1秒～60秒 / 1秒ステップ

F0: フィルターなし
F1: 560nm LP
F2: 620nm LP

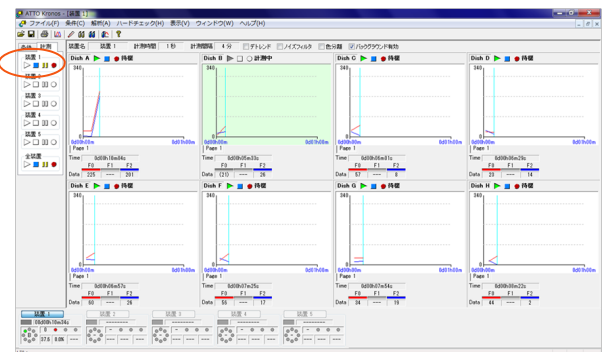
2. 計測条件の設定

計測時間とフィルターを選択します。3色の発光まで同時計測可能です。



3. サンプルのセット

φ35mmのカルチャーディッシュをセットします。8枚までセット可能です。

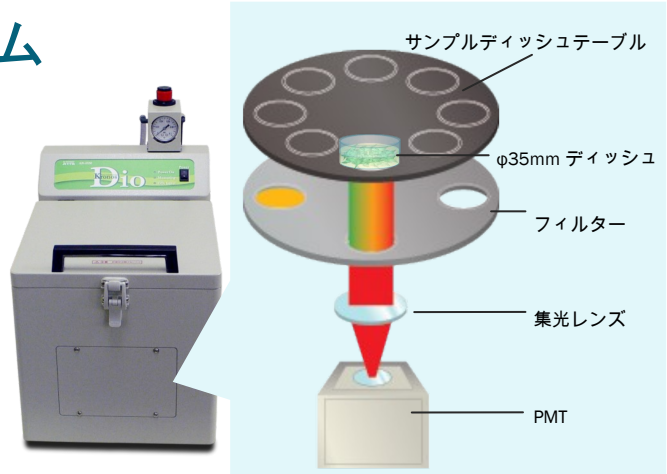


4. 計測のスタート

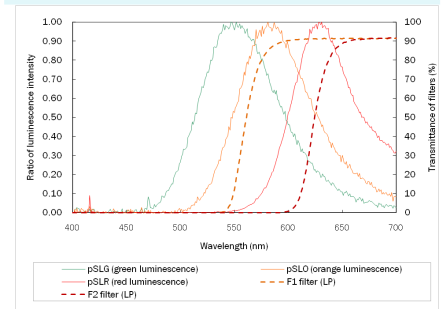
スタートボタン  をクリックするだけで計測が開始します。

3色発光を分離するシステム

クロノスDioのインキュベータ内部は右図のような構造になっています。最大8枚のサンプルをセットできるサンプルディッシュテーブルは、セットしたサンプル間で発光のクロストークが生じないように配置決めされています。サンプルディッシュテーブルの下側には色分離用のフィルターが内蔵されており、その下に集光レンズとPMTが配置されています。色分離用のフィルターは自動的に切り替えられ、それぞれのフィルターを透過した発光は集光レンズにより集光された後にPMTにより検出・計測されます。

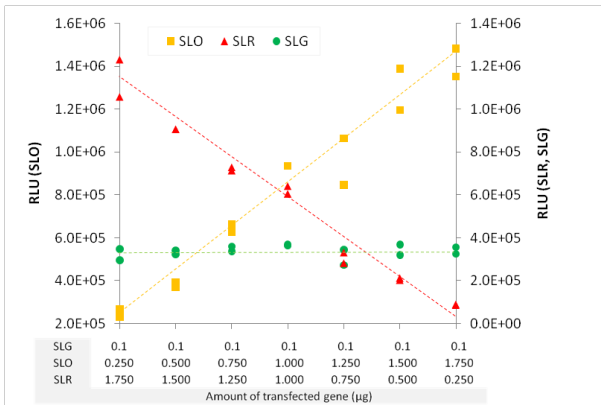


アトーの色分離計測方式は、全光を計測する点と、色分離に使用するフィルターの数が従来法よりも少ない点が特徴です。そのため、フィルターによる発光量の損失を最小限に抑え、実測値に近い値を得ることができます。またロングパスフィルターを使用しており、透過率が90%以上と高く、微弱な発光の計測にも適しています。(特許 第4052389号) 右グラフはTriplucの発光スペクトルと色分離用フィルターの波長と透過率を示しています。



クロノスDioでは、それぞれの発光色に対するフィルター透過率を、色分離条件の設定ウィンドウに入力するだけで、発光色ごとの発光値が自動的に算出されます。

※フィルター透過率はそれぞれの発光色に対するF1/F0、F2/F0の値です。



クロノス DioによりによりNIH3T3細胞で発現している3色のルシフェラーゼの発光を測定した結果です。クロノス Dioは同一細胞内で発光している3色のルシフェラーゼを、細胞が生きたまま経時的に測定し、さらに色分離解析ができます。トランスフェクトしたDNA量に応じた発光測定値が得られることが判ります。

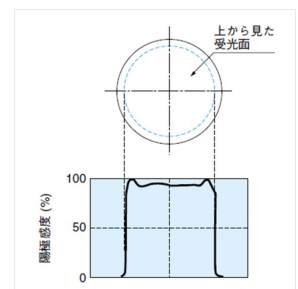
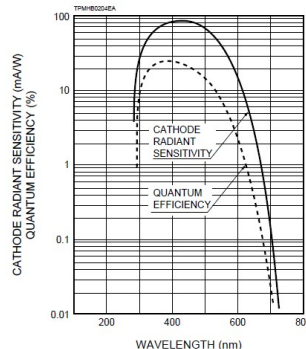
【実験方法】

35mmのカルチャーディッシュに播種したNIH3T3細胞にTriplucのSV40コントロールベクター、pSLG-SV40 control、pSLO-SV40 control、pSLR-SV40 control (TOYOBO社製)をそれぞれ記載したDNA量をリポフェクション法によりトランスフェクトしました。翌日、0.2Mルシフェリン含有培地に交換し、クロノスDioでF0、F1、F2のフィルターを用いて1分間の発光積算値を測定しました。

高感度検出 & 高精度計測

PMTは入射した光を電子に変換する光電面の材質とそれを真空に保つ窓材料によって検出できる波長域が決まります。生物発光の場合は、可視領域の発光ですから主に光電面の材質によって検出効率が決まることになります。光電子増倍管が使われている装置では、波長の異なる発光では同じ光量(ここでは同じ光子数とします)であっても得られるシグナル値は違ってきます。これは、光電面における電子変換効率(量子効率)の波長依存性によるものです。

クロノスDioは波長域が比較的広いPMTを使用しているため、長波長側の赤色発光も感度良く計測することができます。また陽極感度特性が光電面に対してフラットなPMTを使用しているため、サンプルの位置や細胞の播種ムラ等の影響を受けにくく、精度のよい実験を行うことができます。



浜松ホトニクス株式会社カタログより抜粋

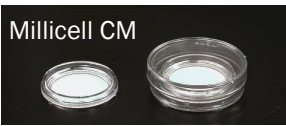
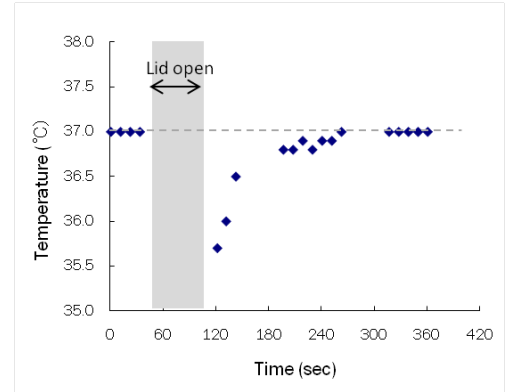
生細胞・組織の生育に適した環境

クロノスDioのインキュベータ内は、細胞あるいは組織を生きのまま長時間観察するために適した環境条件（温度、CO₂ガス濃度、湿度）を安定して提供します。

ペルチェによる恒温装置を装備しており、室温25℃で使用した場合には20～45℃に設定して、長時間にわたり一定温度に保つことができます。右図は37℃で恒温中のクロノスDioの扉を約1分間完全に開放した後に扉を閉め、何分間で温度が元に戻るかを試験した結果です。約2分で温度が37℃に戻り、3分後には安定することが示されました。同様にCO₂ガス濃度と湿度も扉を1分間開放した後に、閉めてから数分間で元の環境条件に戻ることが確認されています。

このように計測途中にサンプルの交換や試薬の添加等を行っても、環境条件による影響が最小限に抑えられることが示されています。

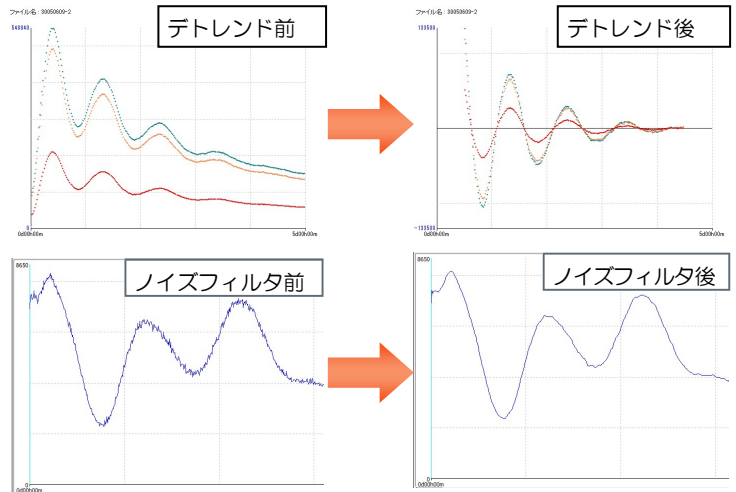
インキュベータ内の温度変化



組織切片をセットする場合には、ディッシュ内で組織切片が動かないように固定してください。カルチャーインサート (Millipore社 Millicell、PICM ORG 50) に組織切片をセットします。

データの解析

- **デトレンド**
一定リズムで振幅するターゲットの発現変動をより明確化します。
- **ノイズフィルタ**
ノイズを減らしてスムージング化します。ノイズフィルタの方法にはメディアンと移動平均の2種類があります。
- **色分離**
多色発光の色成分を分離して算出します。
- **バックグラウンド有効**
バックグラウンド値を減算します。



データの出力・保存

計測データおよび解析データはエクセル形式で出力・保存できます。各サンプルディッシュのデータは別々のシートに自動的に分けられて、1つのファイルに作成されます。各時間ごとの計測結果や温度状況、入力したコメントも出力されます。またグラフ画像はBMP、TIFF、JPEG形式で出力・保存できます。

計測条件		デトレンド後の値-BG				移動平均値					
検体名	30050608-2	F0	F1	F2	バックグラウンド値	F0(移動平均値)	F1(移動平均値)	F2(移動平均値)	濃度 CO2		
ディッシュ名	1163-1										
月日	2005/6/9										
時刻	16:16:48										
計測時間	60 秒										
計測間隔	1620 秒										
バックグラウンド	ON										
計測データ	経過秒	経過時	F0	F1	F2	バックグラウンド値	F0(移動平均値)	F1(移動平均値)	F2(移動平均値)	濃度 CO2	
35	2005/6/10 3:04	38884	10.801111							37.0	
36	2005/6/10 3:31	40504	11.251111							37.0	
37	2005/6/10 3:58	42124	11.701111							37.0	
38	2005/6/10 4:25	43744	12.151111	133496	118854	50924	-7	365016	328102	139663	37.0
39	2005/6/10 4:52	45364	12.601111	113024	98709	44035	-9	368117	331762	141223	37.0
40	2005/6/10 5:19	46984	13.051111	90308	83253	35489	-13	373170	335391	142781	37.0
41	2005/6/10 5:46	48604	13.501111	70112	62128	26895	7	377063	338980	144266	36.9
42	2005/6/10 6:13	50224	13.951111	49553	42456	19318	19				
43	2005/6/10 6:40	51844	14.401111	29413	25757	11465	-21				
44	2005/6/10 7:07	53464	14.851111	11910	7610	4700	-8				
45	2005/6/10 7:34	55084	15.301111	-7741	-6248	3134	-6				

個々のディッシュの測定値が各シートに保存されます。

Kronos Dio のアプリケーション

● リアルタイムレポーター遺伝子アッセイ

転写因子活性
時計遺伝子（時間薬理学）
遺伝子発現挙動（遺伝子導入試薬、RNAi等）

● さまざまな細胞応答の解析

薬物刺激応答（抗ガン剤、DDS等）
ストレス応答（ホルモン、炎症、抗酸化等）
細胞毒性評価

● シグナル伝達系の解析

シグナル伝達系（Ca²⁺濃度変化等）
アポトーシス現象

生物発光と蛍光の特徴

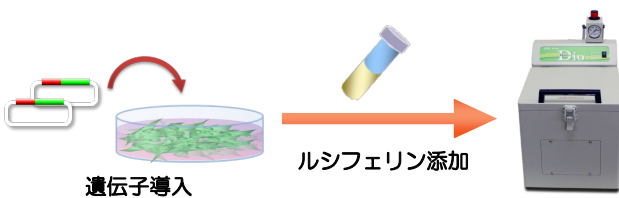
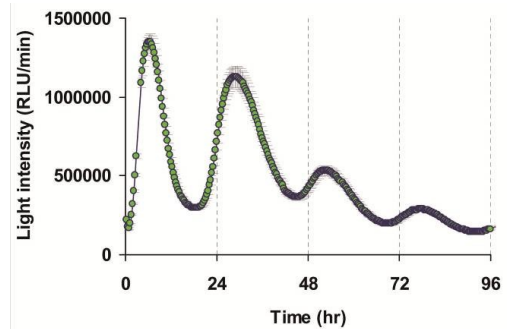
	生物発光	蛍光
プローブ	ルシフェラーゼ、イクオリン、...など	GFP, YFP, RFP, ...など
光の励起	酵素基質（ルシフェリンなど） 励起光は必要ない	基質などは不要 励起光が必要
長所	バックグラウンドが低い 定量的な解析に適している ダイナミックレンジが広い 細胞へのダメージが少ない 長期間の観察に適する	解像度が高い 輝度が高い 撮影時間が短い 励起光による細胞ダメージ
短所	輝度が低い 撮影時間が長い	バックグラウンドが高い 励起光による細胞ダメージ 光退色する

↓
定量的解析
長期間の細胞内挙動

↓
細胞内局在観察
短時間の細胞内挙動

生細胞のリアルタイムレポーターアッセイ

Bmal1プロモーターの下流にルシフェラーゼcDNAを挿入した発現ベクターを、35mmディッシュに播種したマウス由来繊維芽細胞NIH3T3にリポフェクション法により導入しました。Dexamethasoneで刺激後、10%FBS、200μM D-ルシフェリンカリウムを含むDMEM培地に交換し、クロノスDioにて37°Cで4日間発光測定した結果です（1分間の発光積算値）。

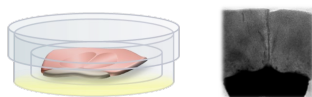
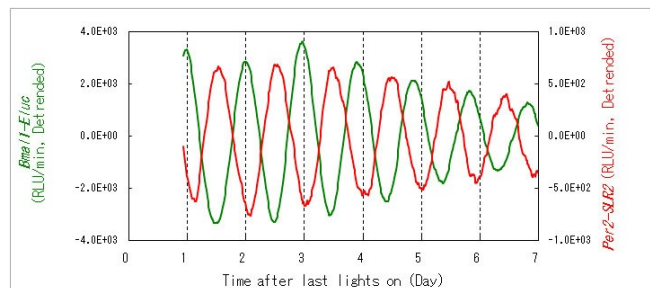


<データご提供>

産業技術総合研究所 健康工学研究部門
セルダイナミクス研究グループ 中島芳浩 先生

生組織のリアルタイムレポーターアッセイ

クロノスDioは発光色の異なるルシフェラーゼレポーター遺伝子を用いることにより、同一サンプル内の複数のターゲット遺伝子の発現変動を経時的に計測できます。生物時計概日リズムに関わる2つの時計遺伝子Bmal1とPer2のプロモーター制御下で緑色発光ルシフェラーゼあるいは赤色発光ルシフェラーゼを発現するトランスジェニックマウスを作製しました。右グラフは、このマウスの脳視交叉上核（SCN）切片を、クロノスDioで1週間発光測定した結果です。Bmal1（グラフの緑線）とPer2（グラフの赤線）が逆位相のリズムで変動していることが判ります。



トランスジェニックマウス脳のSCN切片



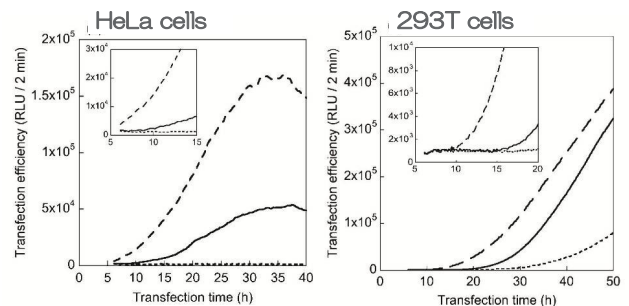
複数遺伝子発現

<データご提供>

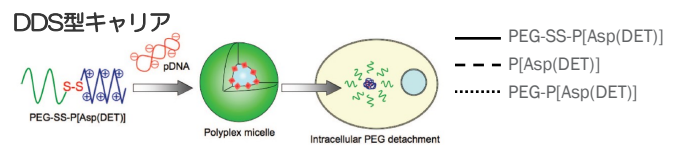
産業技術総合研究所 健康工学研究部門
セルダイナミクス研究グループ
中島芳浩 先生
【引用文献】 T. Noguchi et al. Biochemistry, 49, 8053-8061 (2010)

DDSを利用した遺伝子導入効率の評価

DDS型キャリアを用いて、ルシフェラーゼ遺伝子をHeLa細胞、293T細胞に導入し、クロノスDioで発光の推移を測定しました。細胞内環境に反応してポリマーからPEGが離脱するシステム(PEG-SS-P[Asp(DET)])を用いた遺伝子導入では、非応答性のブロックポリマー(PEG-P[Asp(DET)])やホモポリマー(P[Asp(DET)])を用いた場合と比べて、遺伝子発現の時間的推移に顕著な違いを示すことが明らかとなりました。

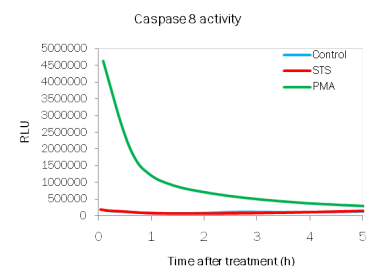
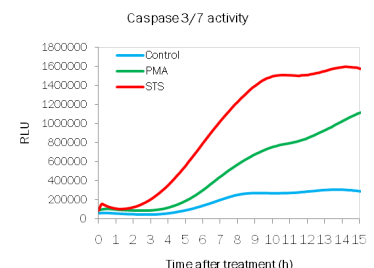
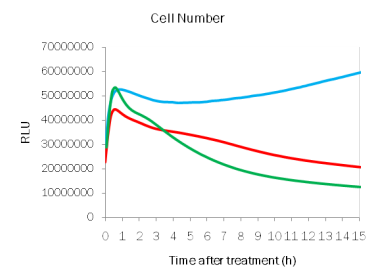
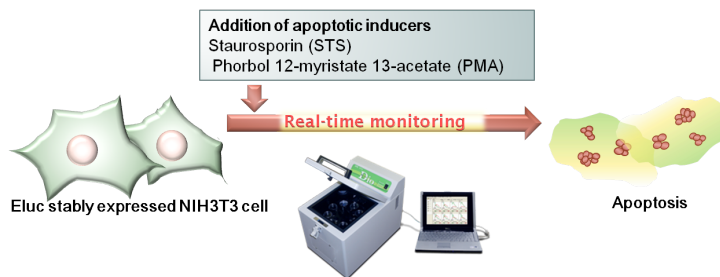


<データご提供> 東京大学大学院医学系研究科
疾患生命工学センター臨床工学部門 位高啓史 先生
【引用文献】 Seiji Takae et. al. *J. AM. CHEM. SOC.*, **130**, 6001-6009 (2008)



アポトーシス現象に関する研究

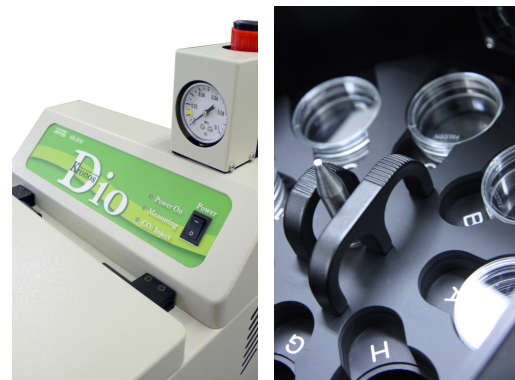
ルシフェラーゼの安定発現細胞を利用すると、細胞毒性実験やアポトーシス現象など細胞傷害応答をクロノスDioで解析することが可能になります。右図はルシフェラーゼ安定発現NIH3T3細胞を、アポトーシス誘導因子であるスタウロスポリン(STS)あるいはホルボールエステル(PMA)で処理し、クロノスDioで発光を計測してアポトーシス現象を解析した結果です(1分間の発光積算値)。細胞数は発光量の変化により、またカスペース活性はプロメガ社のCaspase-Glo® 3/7 substrate、あるいはCaspase-Glo® 8によりモニタリングしました。PMAはカスペース8の活性化を介してカスペース3/7を活性化し、アポトーシスの誘導をしますが、STSはカスペース8の活性化を介さずにカスペース3/7を活性化し、アポトーシスを引き起こすことが判ります。



参考文献

1. F. Sato, M. Kurokawa, N. Yamauchi and M. Hattori, Gene silencing of myostatin in differentiation of chicken embryonic myoblasts by small interfering RNA. *Am. J. Physiol., Cell physiol.*, **291**(3), C538-C545 (2006)
2. J. Hirayama, S. Sahar, B. Grimaldi, T. Tamaru, K. Takamatsu, Y. Nakahata and P. Sassone-Corsi, CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function. *Nature*, **450**, 1086-1090 (2007)
3. S. Takae, K. Miyata, M. Oba, T. Ishii, N. Nishiyama, K. Itaka, Y. Yamasaki, H. Koyama, and K. Kataoka, PEG-detachable polyplex micelles based on disulfide-linked block cationomers as bioresponsive nonviral gene vectors. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 6001-6009 (2008)
4. T. Noguchi, T. Michihata, W. Nakamura, T. Takumi, R. Shimizu, M. Yamamoto, M. Ikeda, Y. Ohmiya and Y. Nakajima, Dual-color luciferase mouse directly demonstrates coupled expression of two clock genes. *Biochemistry*, **49**, 8053-8061 (2010)
5. Jun Sun, Crystal S. Conn, Yan Han, Vincent Yeung, Shu-Bing Qian, PI3K-MTORC1 attenuates stress response by inhibiting capindependent HSP70 translation. *Journal of Biochemistry*, in press (2011)

製品名	AB-2550 クロノスDio (Kronos Dio)
計測容器	細胞培養用ディッシュ φ35mm
検体数	8検体
恒温方式	温度調節：ペルチェ/空気循環方式
庫内温度設定	20℃～45℃ (1℃ステップで設定可能) (使用環境温度-5℃に下限温度が制限されます)
庫内温度精度	設定温度±0.5℃ (室温25℃の場合)
検出器	光電子増倍管 (PMT)
計測方式	光電子増倍管によるフォトンカウンティング方式
検出波長範囲	350 nm～670 nm
計測時間	1～60秒 (1秒ステップで設定可能) 1～60分 (1分ステップで設定可能)
計測間隔	全検体計測に要する時間 1分～300分 (1分ステップで設定可能)
フィルター	F0：フィルターなし (全光) F1：056フィルター (560nm ロングパスフィルター) F2：R62フィルター (620nm ロングパスフィルター)
色分離機構	フィルター自動切替機構 (最大3色まで分離可能)
CO ₂ ガス 精密レギュレータ	最大導入圧: 1 MPa 圧力範囲: 0.007～0.07 MPa
CO ₂ ガス コントローラー	電磁バルブ方式 導入圧: -27～100 kPa 排出圧: 0～50 kPa
CO ₂ ガスセンサー	5% CO ₂ (±0.1%)
クロノスコントロール ソフトウェア動作環境	OS: Windows 10
通信方式	インターフェース: USB (Version 1.1)
寸法	280(W) × 400(D) × 330(H) mm
重量	16.0 kg
価格	3,465,000円



アトー株式会社

主要製品

- 発光・蛍光イメージングシステム
- 画像解析ソフトウェア ●電気泳動装置
- 電気泳動関連試薬 ●ウエスタンブロット試薬
- ペリスタポンプ ●細胞培養・観察システム

- 東京本社 〒111-0041 東京都台東区元浅草3-2-2 ☎(03)5827-4861(代表) ☎(03)5827-6647
- 大阪支店 〒530-0044 大阪市北区東天満2-8-1 ☎(06)6136-1421(代表) ☎(06)6356-3625
若杉センタービル別館 5F
- 技術開発センター 〒110-0016 東京都台東区台東2-21-6 ☎(03)5818-7560(代表) ☎(03)5818-7563
◆メンテナンスサービスグループ ☎(03)5818-7567(代表) ☎(03)5818-7563

■URL <https://www.atto.co.jp/>

お問い合わせ WEB会員登録の上お問い合わせフォームをご利用ください。

生化学・分子生物学・遺伝子工学研究機器
開発/生産/販売/サービス