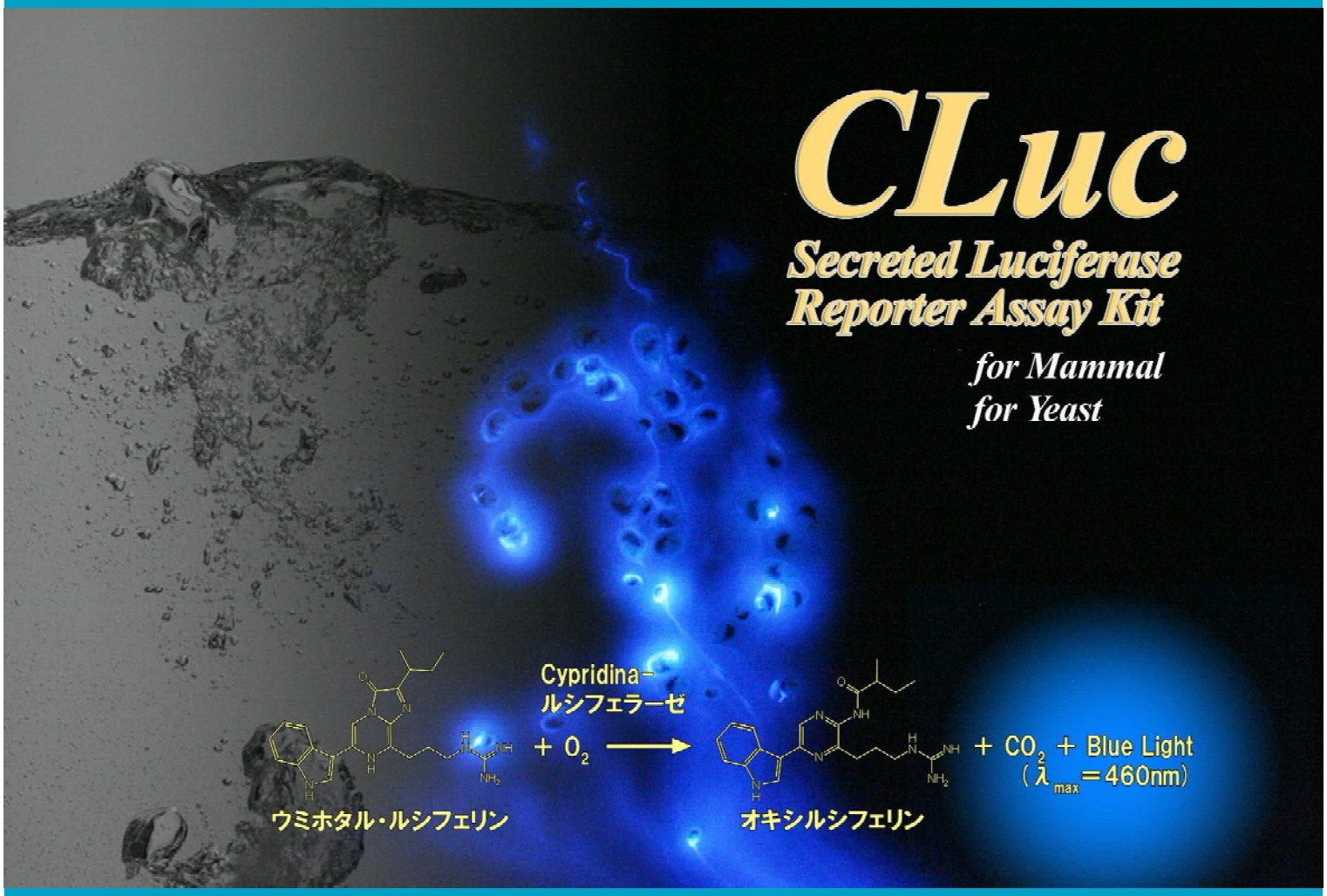
2025 年 10 月価格改定版

分泌型ルシフェラーゼをつかったレポーターアッセイシステム



CLucタンパク質はウミホタル由来です
写真は *Cypridina noctiluca* です。

特長

- ●細胞溶解が不要（細胞外へ分泌）
- ●細胞内への蓄積が非常に少ない
  （このため、細胞毒性が低く継続して培養可能）
- ●発光試薬と混ぜるだけで検出可能
- ●発光反応はATPなどが不要
- ●動物細胞用と酵母細胞用をラインナップ

「分泌」を活かした利用方法

★ハイスループットアッセイ

★同一細胞でのタイムコース実験
遺伝子発現・転写制御の研究
刺激応答による創薬・薬理研究
などに最適

ATTO
SupportingLifeResearch

システムの概要とCLucの性質

●システム概要

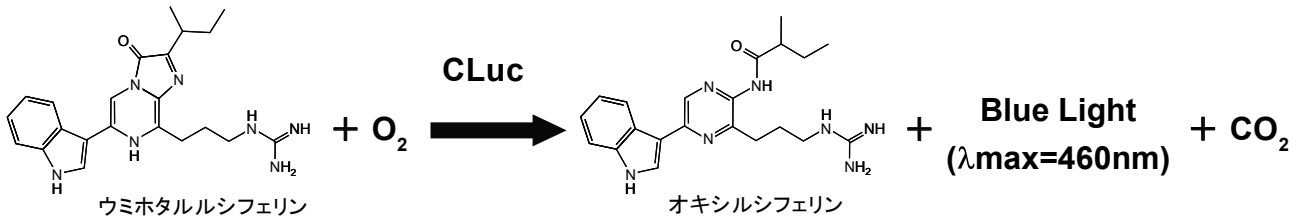
CLuc reporter assay kit はウミホタル近縁種(*Cypridina noctiluca*)に由来する発光酵素(61.4kDa)と、 基質であるウミホタルルシフェリンの酸化により発する青い光(460nm付近)を利用して遺伝子転写活性を測定するレポーターアッセイシステムです。(Ref. 1) また、発光反応に ATP などを必要としません。

近年、 レポーターアッセイはタンパク質相互作用解析、 プロモーターの機能解析、 転写因子の機能解析、 遺伝子発現ネットワーク解析などのポストゲノム研究における重要な実験技術のひとつとなっています。 ポストゲノム時代におけるバイオアッセイは、 ハイスループット対応・高感度・簡便であることが重要な要件となっています。 これまでよく用いられてきたレポータータンパク質にはホタルルシフェラーゼ、bガラクトシダーゼ等があります。これらの酵素は細胞内の酵素で、測定には細胞の回収、破砕が必要です。細胞の回収、 破砕はロボットによる自動化に適さず、 ハイスループット化が非常に困難でした。

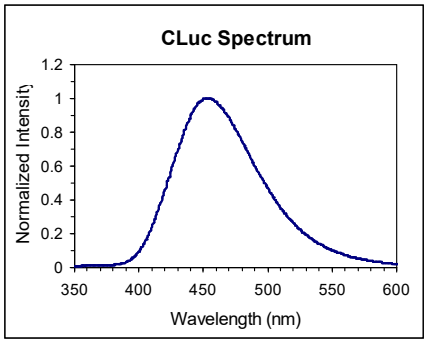
本システムで用いられるシプリジナ・ルシフェラーゼ(CLuc)レポータータンパク質は細胞外へ速やかに分泌されるので、 培地をフラクションしてルミノメータで計測すればよく、そのため細胞溶解の必要がありません。これにより、同一細胞を継続して培養し遺伝子発現の連続モニターが可能となり、 多検体が必要であったタイムコース実験を行うことができます。

これらの特長によってポストゲノム時代の鍵となっているハイスループット、高感度、簡便の要素を満たし、革新的な実験時間短縮・新規実験手法の開拓が可能になります。

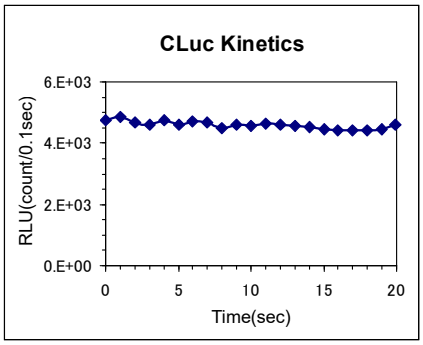
●CLuc発光反応図



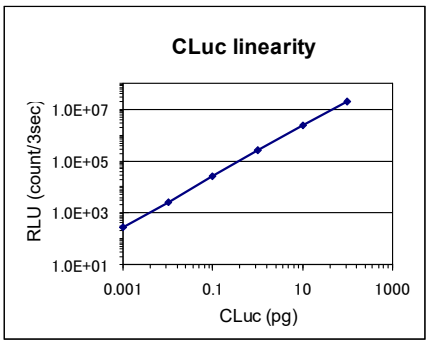
●CLucの性質



CLuc は 460nm の極大発光波長を示します。

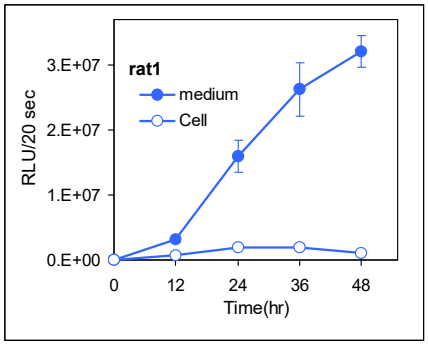


CLuc は 20 秒間安定して発光します。



CLuc のダイナミックレンジは 5 桁です。
(培地、測定機器などの条件によって変化します。)

●細胞外への分泌



左のグラフは、ラット繊維芽細胞rat1にCLucコントロールベクターをトランスフェクションした後、 分泌された CLuc と細胞内に残った CLuc の量を活性測定により比較したものです。トランスフェクション後、 12 時間ごとにフラクションした培地 (分泌された CLuc を含む) と細胞内の CLuc の活性をルミノメータで計測しました。
その結果、 CLuc は時間経過ごとに発現量が増えると、 細胞外への分泌量は増加しますが、 細胞内の CLuc の蓄積は少ないことが推測されました。

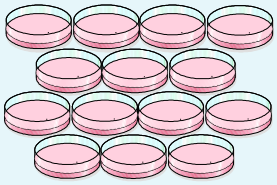
(本データは産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門よりご提供いただきました。)

CLucの特長を生かした実験例

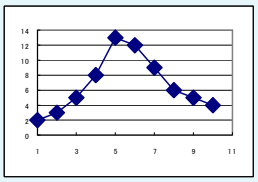
同一細胞でのタイムコース実験（培養細胞）

●従来の方法(ホタルルシフェラーゼ)では・・・

・測定時間ごとの細胞回収。大量の細胞が必要。
・少ないサンプリングポイント。



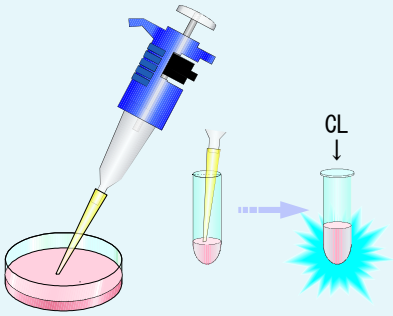
大量の細胞が必要



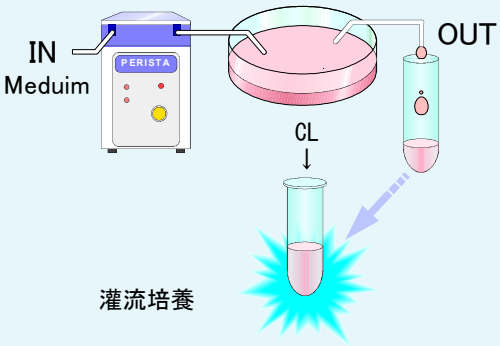
少ないサンプリングポイント

●CLucでは・・・

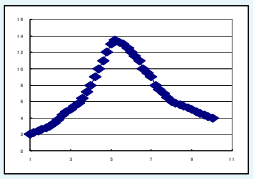
・培地の一部で経時的に測定可能。
・灌流培養では連続サンプリングも可能。
・細胞回収の必要なし。



培地の一部で測定可能



灌流培養

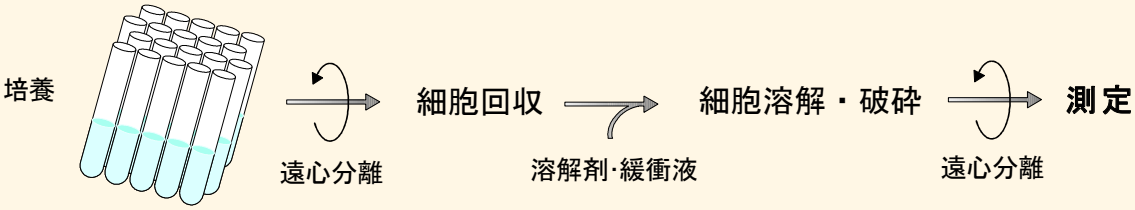


連続サンプリングが可能

ハイスループット測定に対応（酵母）

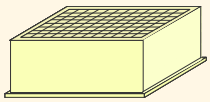
●従来の方法(βガラクトシダーゼ(β -gal)、ホタルルシフェラーゼ)では・・・

・測定のステップが多い。
・自動化が困難。



●CLucでは・・・

・培地のまま測定可能。
・96wellフォーマットに対応し、分注ロボットによるハイスループット化が可能。



→ **培地の一部を測定**

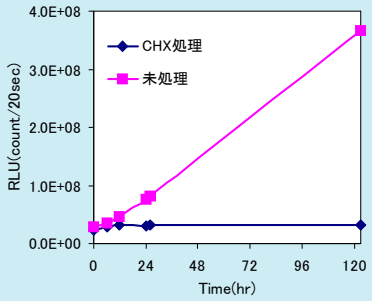
96穴ディープウェルプレートで培養

CLucレポーターアッセイキット　動物細胞用

「CLuc レポーターアッセイキット 動物細胞用」は培地中の CLuc 活性を測定するレポーターアッセイキットで、動物細胞用ベクターセット、発光基質セット、標準酵素セットで構成されています。レポータータンパク質である CLuc は速やかに動物細胞外（培地中）へ分泌されます。このため CLuc の活性測定は細胞の破砕・溶解の必要がなく、培地を採取すればルミノメータで測定できます。CLuc は発現したタンパク質のほとんどが細胞外へ分泌されるため、細胞毒性が低く、連続培養が可能です。

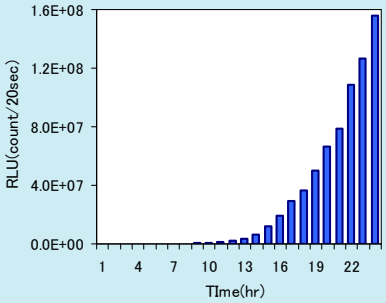
●転写活性のタイムコース測定

Fig.1



CLuc タンパク質の安定性を調べるために、COS7 細胞の CLuc 安定発現株にシクロヘキシミド(CHX)を加えてタンパク合成を阻害しました。未処理の細胞の場合では CLuc 活性値が経時的に上昇するのに対して、CHX 処理した細胞の CLuc 活性は 5 日間でほぼ一定でした。したがって、CLuc は培地中で長時間安定なことが示されました。

Fig.2

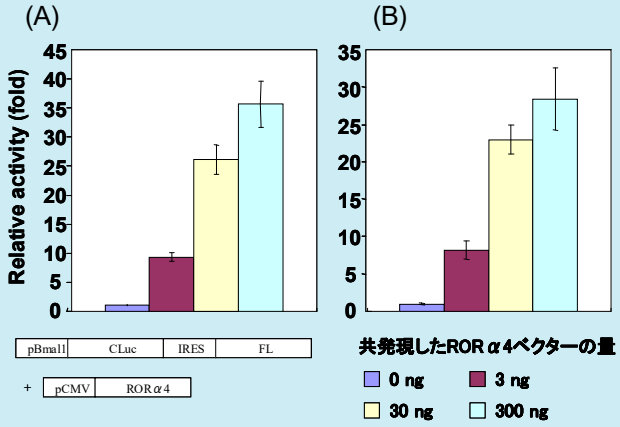


COS7 細胞に CLuc コントロールベクター pCL-sv を導入し、その 24 時間後から培地中の CLuc 活性を 1 時間ごとに計測しました。CLuc タンパク質は培地中で長期間安定なので（Fig.1）、各タイムポイントごとの発光量の差をプロットすることで、転写活性の経時変化を示すことができます。

●実験例：時計遺伝子 *Bmal1* プロモーターの転写活性測定

(K. Yamagishi, et al., Ref.2, ※1)

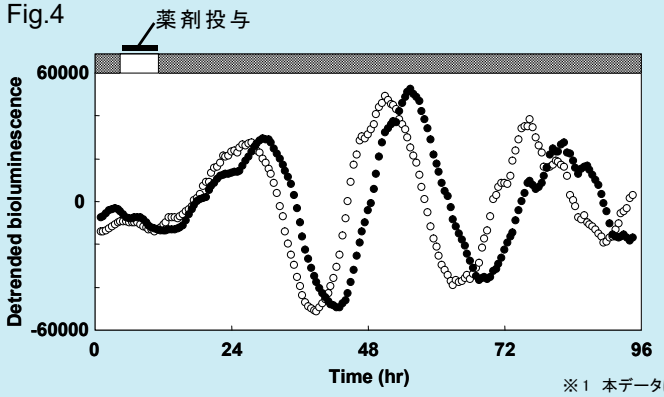
Fig.3



体内時計の制御に関与する時計遺伝子 *Bmal1* プロモーターの転写活性を CLuc を用いて測定しました。*Bmal1* プロモーターは 24 時間周期で遺伝子発現を制御すること、転写因子 RORa4 によって発現が誘導されることが知られています。

転写因子 RORa4 を共発現させ、RORa4 ベクター導入量依存的に *Bmal1* の転写活性が促進されることを測定できました(Fig.3A)。また、レポーターとして従来使われているホタルルシフェラーゼ(FL)で測定した場合(Fig.3B)と比較して、よく一致する結果が得られました。

Fig.4



Bmal1 プロモーターを挿入した CLuc ベクターを rat1 細胞に導入して灌流培養し、フラクションコレクターで灌流液を連続分取して発光測定することによって、転写活性の経時変動を連続測定しました(Fig.4)。

一過的に灌流液に Dexamethasone を加えて流し（Fig.4 上側の白ヌキ部分）、約 24 時間周期のリズムを検出しました（○）。さらに Dexamethasone と共に SP600125（c-Jun N-terminal kinase 阻害剤）を与えた場合には、リズムの位相が後方へシフトしました（●）。

※1　本データは産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門よりご提供いただきました。

CLucレポーターアッセイキット　酵母細胞用

「CLucレポーターアッセイキット 酵母用」は培地中のCLuc活性を測定するレポーターアッセイキットで、酵母用ベクターセット、発光基質セット、標準酵素セットで構成されています。レポータータンパク質であるCLucは速やかに酵母細胞外（培地中）へ分泌されます。このためCLucの活性測定は細胞の破砕・溶解の必要がなく、培地を採取すればルミノメータで測定できます。

酵母用ベクターに組み込まれているCLuc遺伝子は、酵母用として最適化されていますので効率的に発現します。非特異的な転写を抑えるため、既知の転写制御配列をできる限り排除するようデザインしました。

●CLucレポーターアッセイとβ－Galレポーターアッセイと の比較

★CLucレポーターアッセイ法

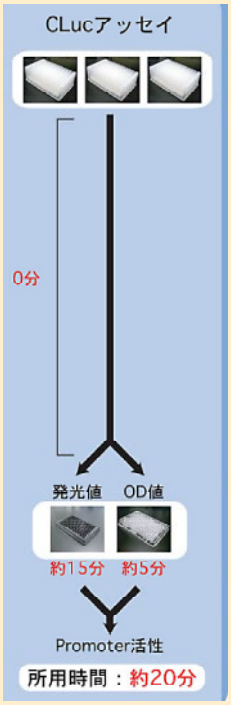


Fig.1

酵母のいくつかのプロモーターで転写活性をCLucレポーターアッセイ法(Fig.1)と代表的な従来法β－Galレポーターアッセイ法（Fig.2)とで比較しました。アッセイ時間で比較すると、CLucレポーターアッセイ法はβ－Galレポーターアッセイ法のおよそ1/10の時間で相関のある結果を得ることができ、ハイスループットアッセイに適していることが示されました。

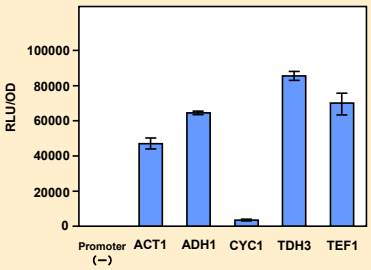


Fig.1

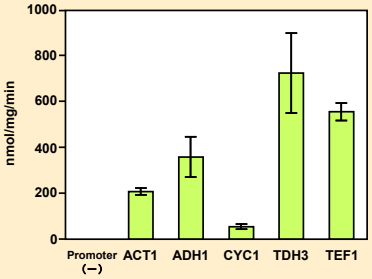


Fig.2

★β－Galレポーターアッセイ法

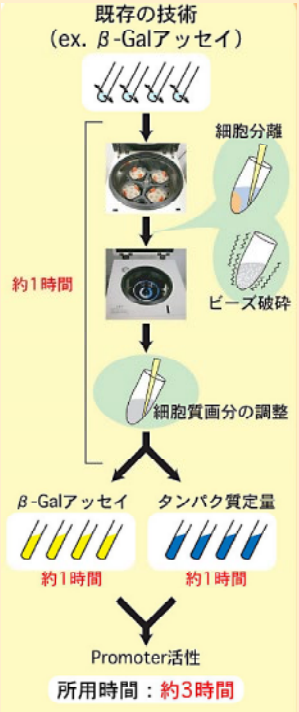
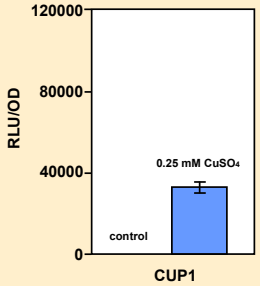
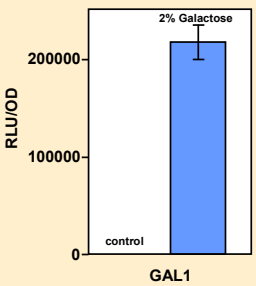


Fig.2

●誘導実験

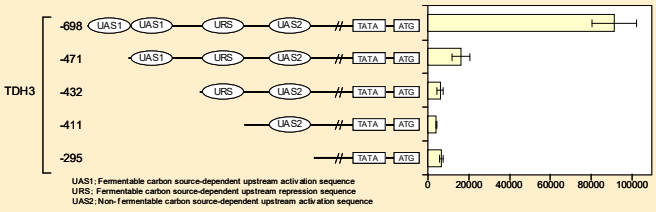




*CUP1*プロモーターは培地へのCu^{2+}イオンの添加によって、また*GAL1*プロモーターは炭素源を培地のガラクトースとすることによって発現が誘導されることが知られています。

*CUP1*及び*GAL1*プロモーターを用いたCLucレポーターアッセイ法により、これらの誘導剤による転写活性化が測定されました。

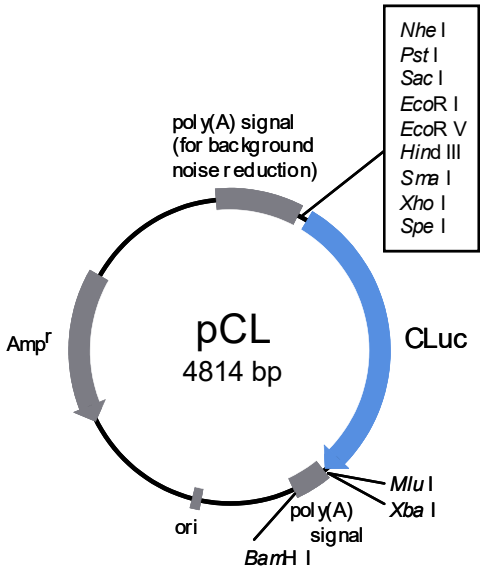
●プロモーター内の転写制御配列の探索



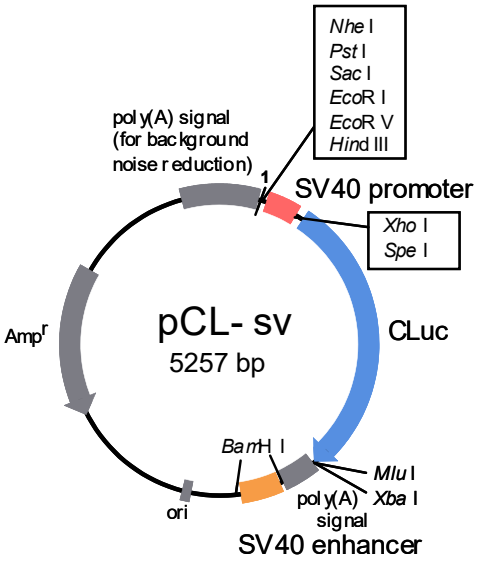
*TDH3*プロモーターには3つの転写制御配列が知られています。*TDH3*プロモーターの5’側から順次欠失させた配列を用いてCLucレポーターアッセイで転写活性を測定したところ、転写制御配列の有無による転写能の増減が測定されました。この結果は既報の結果とよく一致しています。

＜上下データは産業技術総合研究所ゲノムファクトリー研究部門　扇谷悟先生よりご提供いただきました。

動物細胞用ベクター

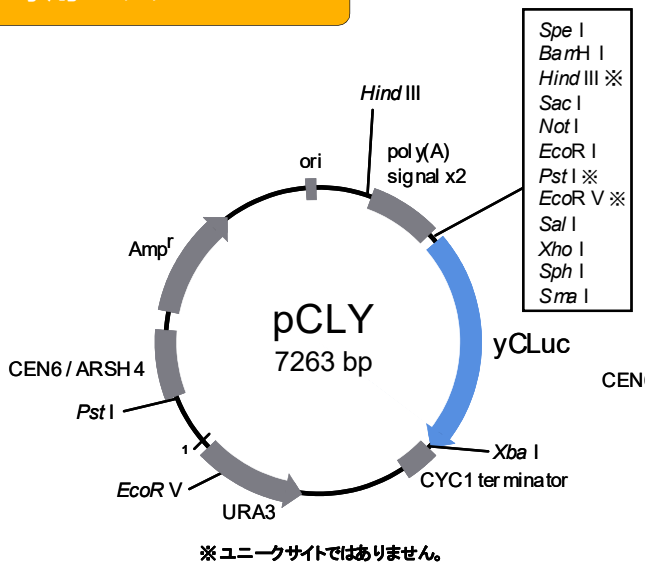


プロモーターレスベクター



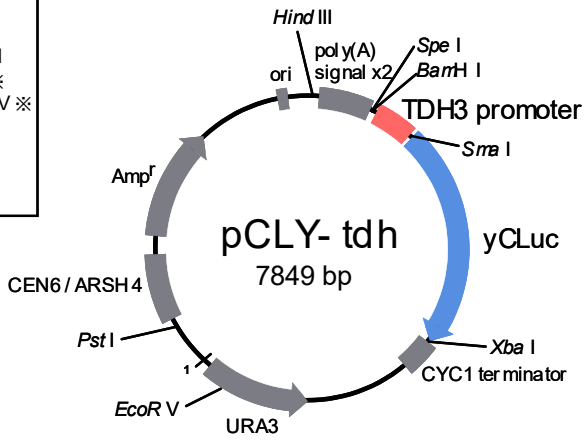
コントロールベクター

酵母用ベクター



※ユニークサイトではありません。

プロモーターレスベクター



コントロールベクター

本製品は研究用試薬です。 研究用途以外に使用しないで下さい。
本発光システムにはアトー株式会社及び(独)産業技術総合研究所の特許が使われています。
非営利目的で CLuc レポーターアッセイキット（遺伝子ベクター含む）をご購入の際には事前に購入申込書のご提出が必要になります。
営利目的でのご使用につきましては、 別途実施許諾契約が必要になります。 実施許諾契約に関してはアトー株式会社までお問合せ下さい。
掲載されている内容は予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承下さい。

お問い合わせ
アトー株式会社 顧客部　TEL 03-5827-4861 FAX 03-5827-6647　　e-mail : info@atto.co.jp

販売方法が一部変更になりました。

価 格

CLucレポーターアッセイキット

コードNo.	型式・製品名	容量	価格
3512037	CL-M100 CLucレポーターアッセイキット動物細胞用	100アッセイ	¥39,800
3512038	CL-M1000 CLucレポーターアッセイキット動物細胞用	1000アッセイ	¥99,800
3512039	CL-Y100 CLucレポーターアッセイキット酵母細胞用	100アッセイ	¥39,800
3512040	CL-Y1000 CLucレポーターアッセイキット酵母細胞用	1000アッセイ	¥99,800

CLuc消耗品（継続購入用）

コードNo.	型式・製品名	容量	価格
3512031	CL-S100 CLuc発光基質100	100アッセイ	¥26,800
3512032	CL-S1000 CLuc発光基質1000	1000アッセイ	¥99,800
3512030	CL-E CLuc標準酵素	80μL	¥14,800
3512033	CL-VM1 CLucプロモーターレスベクター動物細胞用（pCL vector）	10μg	¥16,800
3512034	CL-VMC1 CLucコントロールベクター動物細胞用（pCL-sv vector）	10μg	¥16,800
3512035	CL-VY1 CLucプロモーターレスベクター酵母細胞用（pCLY vector）	10μg	¥16,800
3512036	CL-VYC1 CLucコントロールベクター酵母細胞用（pCLY-tdh vector）	10μg	¥16,800

CLuc レポーターアッセイキットおよび消耗品は受注生産品です。

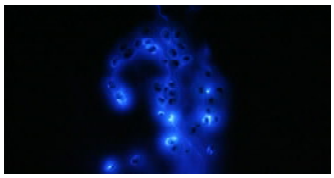
References

1) Nakajima, Y., Kobayashi, K., Yamagishi, K., Enomoto, T., and Ohmiya, Y., cDNA Cloning and Characterization of a Secreted Luciferase from the Luminous Japanese Ostracod, *Cypridina noctiluca. Biosci. Biotechnol. Biochem*., 68(3), 565-570 (2004)

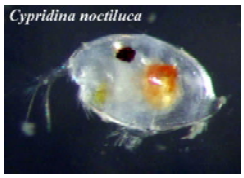
2) Yamagishi, K., Enomoto, T., and Ohmiya, Y., Perfusion-culture-based secreted bioluminescence reporter assay in living cells. *Anal. Biochem*., 354(1), 15-21 (2006)

3) 中島 芳浩, 近江谷克裕「遺伝子発現リアルタイム解析への発光イメージングの応用」バイオテクノロジージャーナル Vol.6, No.2, 230-232 (2006)

ご用命は下記販売店まで



表紙写真ご提供：
北海道大学大学院医学研究科
近江谷克裕先生



表紙写真ご提供：
小江克典様

$0.1=10^{-1}$	deci	d	one	tenth of
$0.01=10^{-2}$	centi	c	one	hundredth of
$0.001=10^{-3}$	milli	m	one	thousandth of
$0.000\ 001=10^{-6}$	micro	μ	one	millionth of
$0.000\ 000\ 001=10^{-9}$	nano	n	one	billionth of
$0.000\ 000\ 000\ 001=10^{-12}$	pico	p	one	trillionth of
$0.000\ 000\ 000\ 000\ 001=10^{-15}$	femto	f	one	quadrillionth of
$0.000\ 000\ 000\ 000\ 000\ 001=10^{-18}$	ATTO	a	one	quintillionth of

アトー株式会社

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

主要製品
●発光・蛍光イメージングシステム
●画像解析ソフトウエア ●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) FAX(03)5827-6647
■大阪支店 〒530-0044 大阪市北区東天満2-8-1 若杉センタービル別館 5F ☎(06)6136-1421(代表) FAX(06)6356-3625
■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) FAX(03)5818-7563
◆メンテナンスサービスグループ ☎(03)5818-7567(代表) FAX(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。