

BIOSYNTH[®]
Carbosynth

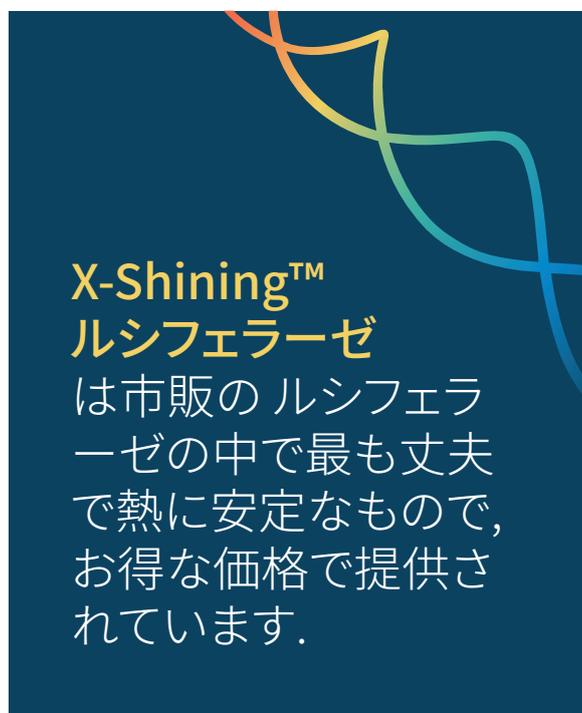
X-Shining[™]

熱安定性

ルシフェラーゼ

X-Shining™ 熱安定性ルシフェラーゼ

弊社(Biosynth Carbosynth)の熱安定性修飾されたX-Shining™ ルシフェラーゼは、D-ルシフェリン(dLuc)または合成ルシフェリン類(ケージ型ルシフェリン)を用いたルシフェリン-ルシフェラーゼ系アッセイに最適です。典型的な応用例は、衛生モニタリング、創薬スクリーニング、微生物検査における細菌の同定でのATP試験です。弊社の新しいX-Shining™ルシフェラーゼは遺伝子組換えで強い熱安定性と貯蔵安定性を付与させたものです。X-Shining™ルシフェラーゼはグリセロール水溶液でお届けしており、それは何か月も室温で保管して、機能の損失はほとんどありません。耐熱試験でこの酵素は60°Cで1時間以上でも活性が損なわれません。一方、通常のホタル・ルシフェラーゼでは同じ試験において数分間で活性が失われます。この酵素は使用者にやさしく、通常使用されるワイルドタイプのルシフェラーゼの主な欠点を解消します。遺伝子工学、タンパクの大量発現技術および精製技術で、弊社は90%以上の純度のルシフェラーゼを製造できるため、この酵素の費用対効果がワイルドタイプのホタル (*Photinus pyralis*) ルシフェラーゼより高いです。



**X-Shining™
ルシフェラーゼ**
は市販のルシフェラーゼの中で最も丈夫で熱に安定なもので、お得な価格で提供されています。

CAS 番号	61970-00-1
コード	BX174908, L-8093
製品名	X-Shining™ ルシフェラーゼ
内 容	北米のホタル <i>Photuris pennsylvanica</i> のルシフェラーゼに遺伝子組換えで熱安定性を付与したもの。グリセロールを含んだ 10 mg/mL 水溶液で供給されます。

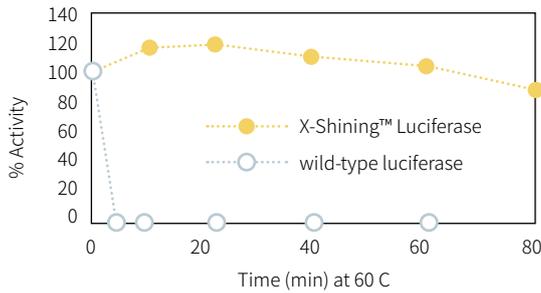
内容量	価格 (\$)
100 µL (1 mg)	115.00
250 µL (2.5 mg)	275.00
500 µL (5 mg)	500.00
1 mL (10 mg)	850.00

イントロダクション

生物発光法は、暗いバックグラウンドに対して光シグナルを測定できるという点で、高感度が必要とされる検出システムとして、通常の発色法や蛍光法より大きな利点があります。それは真っ暗な夜空で星を観察するのと同様です。大掛かりな装置を必要とせず素晴らしく高感度な試験法は近年多くの分野で他の方法にとって代わっています。

分子遺伝学で、ルシフェラーゼによるレポーター・アッセイはプロモーターとルシフェラーゼ酵素発現系を含むベクターのトランスフェクションから成っています。特異的な転写因子の存在下でプロモーターが活性化され、ルシフェラーゼが産生され典型的な発光反応を引き起こします。レポーター・アッセイは遺伝子発現、転写後修飾、タンパク-タンパク間相互作用、遺伝子治療のツールとしてのシグナルトランスダクション・パスウェイ等の研究、創薬のためのハイスループット・スクリーニングに採用されています。

生物発光に基づく試験法は衛生管理、食品・飲料水の微生物制御、臨床微生物学でも大きなポテンシャルがあります。しかしながら、インビトロ・アッセイでのルシフェラーゼの使用はコスト効果があり安定なルシフェラーゼが入手できるかにかかってきます。現在、安価で安定な新製品 X-Shining™ ルシフェラーゼがお求め可能になりました。



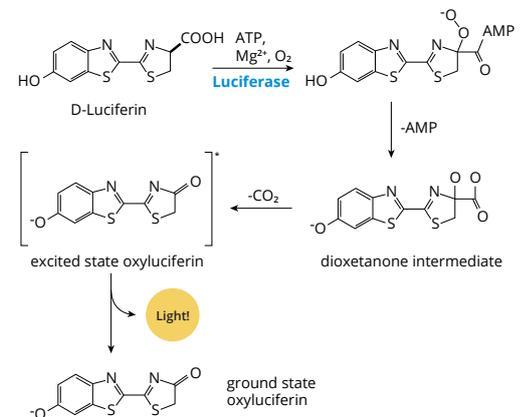
X-Shining™ ルシフェラーゼとホタル (*Photinus pyralis*) 由来ワイルドタイプ・ルシフェラーゼとの熱安定性の比較。

X-Shining™ ルシフェラーゼは60°Cで60分間、静置しても活性が維持された。一方、標準的なルシフェラーゼは10分間で完全に不活化された。

加えてX-Shining™ルシフェラーゼでは、発光シグナルの安定性がホタル由来ワイルドタイプ・ルシフェラーゼと比較して顕著に増加している。

ルシフェリン-ルシフェラーゼの発光機構

発光を見るには、ルシフェリンが酸化して励起中間体となる必要があります。その反応は酸素、ATPおよびMg²⁺補欠因子の存在下で起きます。生物発光の主な経路は、ルシフェリンとATPとの反応でルシフェリル・アデニレートが生成することから始まります。単一電子転移によってルシフェリル・アデニレートの酸化が起こり、中間体の過酸化物が生成され、さらにジオキサノンに転換します。ジオキサノン中間体の分解に付随してCO₂が遊離し、励起状態のオキシルシフェリンが生成します。さらにそれが基底状態に戻るときに黄緑色の光(557 nm)を発します。

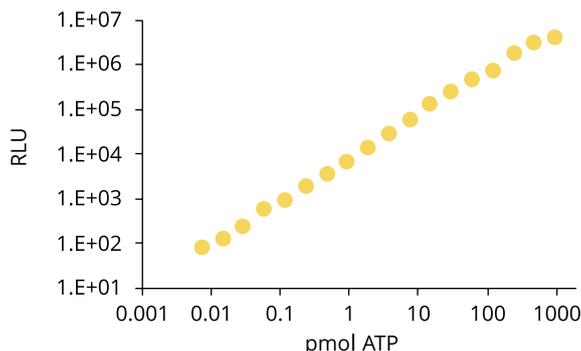


熱安定性X-Shining™ ルシフェラーゼの応用例

応用例 1: ATPアッセイ

アデノシン三リン酸(ATP)はすべての生物の細胞に存在し、エネルギー・バランスに中心的役割を演じています。ATPの細胞内濃度はしっかり制御されていて、すべての細胞で同じレベルで保たれています。細胞が死ぬとそのATPが完全に分解されます; ゆえにATPレベルは生きている細胞の存在を反映します。生物発光に基づくアッセイは極めて高感度で、標準的なルミノメーターでも0.1ピコモルのATPが検出できます。

高感度であることで、血液、尿、乳などの試料中の低いレベルの細菌汚染を検出することが可能になりました。ルシフェリン-ルシフェラーゼ・アッセイは、抗生物質の細菌数に対する効果を調べることで使用されています。



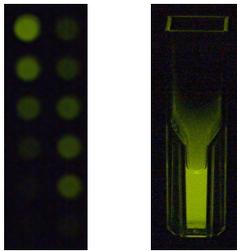
RLU: Relative Luminescence Unit

X-Shining™ ルシフェラーゼによるATPの定量

X-Shining™ ルシフェラーゼはD-ルシフェリンを用いた、液量0.1 mLの96穴プレート・アッセイで、ATP濃度8 fmol から 1 nmol までの広い範囲で、きれいな線形を示した。

ルシフェリン-ルシフェラーゼ・システムはATP濃度定量のための極めて高感度で正確なツールです。

応用例 2: ルシフェラーゼとプロルシフェリン類 (ケージ型ルシフェリン類) を用いた酵素活性の測定



ルシフェリン-ルシフェラーゼ系による酵素活性の測定。
左はマイクロ・プレート、右は試験管。

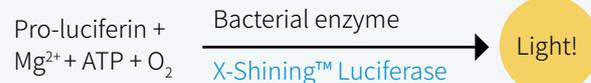
ルシフェラーゼ生物発光は基質として酵素と反応しやすい部位に結合させたD-ルシフェリンまたはアミノルシフェリンを酵素と反応しやすい部位に結合させた基質を使って、広範囲の酵素活性の高感度検出に用いられます。ルシフェリンに基づく基質は科学文献では「ケージ型ルシフェリン類」または「プロルシフェリン類」と呼ばれています。たとえば、プロルシフェリン類は細菌の特定の群の検出、動物/植物細胞のレポーター・アッセイなどに使用できます。

連結酵素アッセイは 同じ反応液に試料、プロルシフェリン基質およびルシフェラーゼを入れて行います。試料の酵素活性を正確に測るために、一連の酵素濃度の液を作成し、同じ反応条件で測定します。次に、試料の発光シグナルを一連の濃度の酵素液の発光シグナルと比較します。

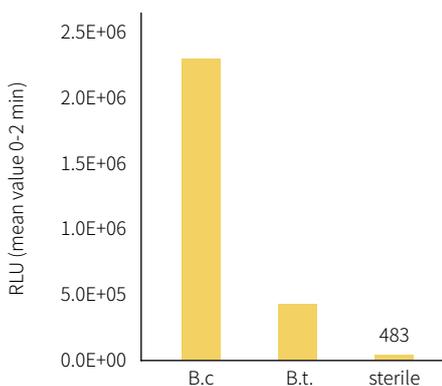
熱安定性酵素が入手できるようになったので
応用例が急速に増えています。

応用例 3: プロルシフェリン類による細菌の検出

プロルシフェリンを微生物分析に採用することで、新しい生物発光に基づく細菌検出に道が開かれました。この仕組みでは、細菌をかなり低い細菌濃度に培養し、続いて生物発光基質 (プロルシフェリン) を加えます。その細菌に特異的な酵素が基質から酵素の作用を受けやすい部位を切り取り、D-ルシフェリンを遊離します。それから、ATP、マグネシウムイオン、酸素の存在下で、D-ルシフェリンとルシフェラーゼが反応して発光します。



ルシフェラーゼはルシフェリンの濃度が極めて低くても検出できるので、生菌数の検出下限を低めることを可能にしました。例えば、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) やセレウス菌 (*Bacillus cereus*) のようなホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼC (PC-PLC) 陽性菌を検出することができます。



D-ルシフェリン・コリンホスフェート、ATPおよびルシフェラーゼを加えた細菌培養液の発光

室温でプレートリーダーで記録した。 *Bacillus cereus* (B.c.) の培養液では強い発光を示したが、一方PC-PLC 陰性の *B. thuringiensis* (B.t.) の培養液と無菌コントロールは明らかに低いRLU値を示した。

本酵素の安定性 — 使用しやすい:

ルシフェラーゼ液の安定性: ろ過滅菌したX-Shining™ ルシフェラーゼのアッセイ・バッファー液は室温で少なくとも7か月、安定です。その液は冷蔵庫で保管すればもっと長い期間、ご使用になれるでしょう。

X-Shining™ルシフェラーゼとともに
Biosynth Carbosynth社のルシフェリンを使って光らせよう!

関連製品の例

ルシフェリン類

CAS 番号	コード	製 品	内容量	価格(\$)
115144-35-9	L-8221	D-Luciferin Firefly, potassium salt - Endotoxin-free	0.25 g	188.00
			0.5 g	258.00
115144-35-9	L-8230	D-Luciferin Firefly, potassium salt - white	0.05 g	120.00
			0.1 g	192.00
			0.5 g	460.80
103404-75-7	L-8241	D-Luciferin Firefly, sodium salt monohydrate - Endotoxin-free	0.25 g	188.00
			0.5 g	258.00
2591-17-5	FL08607	D-Luciferin free acid	25 mg	23.25
			250 mg	147.50
115144-35-9	FL08608	D-Luciferin potassium salt	50 mg	50.00
			500 mg	215.00
103404-75-7	FL08609	D-Luciferin sodium salt	100 mg	65.00
			500 mg	225.00

プロルシフェリン類とATP

CAS 番号	コード	製 品	内容量	価格(\$)		
131474-38-9	EL28834	D-Luciferin-6-O b-D-galactopyranoside	1 mg	57.80		
			10 mg	378.00		
	EL08610	D-Luciferin-6-O b-D-glucopyranoside	5 mg	108.00		
			50 mg	730.00		
			L-8122	D-Luciferin-beta-D-glucuronide, dipotassium salt	5 mg	90.00
			50 mg	607.50		
			L-8281	Luc-Salmonella (D-Luciferin caprylate)	5 mg	120.00
			50 mg	810.00		
	L-8120	D-Luciferin-myo-inositol-1-phosphate, sodium salt	5 mg	157.50		
			50 mg	1057.50		
			L-8275	Luc-B.cereus Na (D-Luciferin-6-O-cholin phosphate sodium)	5 mg	175.00
50 mg	1175.00					
34369-07-8	NA00135	Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate	100 g	65.00		
			500 g	225.00		

■ 価格は変動することがあります。最近の価格は、弊社のウェブサイトをチェックするか、弊社のセールス・チームのアドレス sales@biosynth-carbosynth.com にお問い合わせください。

参考文献

- McCapra, F., Q. Rev., Chem. Soc. 1966, 20 (4), 485-510.
 Kaskova, Z. M.; Tsarkova, A. S.; Yampolsky, I. V., Chem. Soc. Rev. 2016, 45 (21), 6048-6077.
 Rathbun, C. M.; Prescher, J. A., Biochemistry 2017, 56 (39), 5178-5184.
 Thornberry, N. A.; Rano, T. A.; Peterson, E. P.; Rasper, D. M.; Timkey, T.; Garcia-Calvo, M.; Houtzager, V. M.; Nordstrom, P. A.; Roy, S.; Vaillancourt, J. P.; Chapman, K. T.; Nicholson, D. W., J. Biol. Chem. 1997, 272 (29), 17907-17911.
 Monsees, T.; Miska, W.; Geiger, R., Anal. Biochem. 1994, 221 (2), 329-334.
 Martha, A. O. B.; William, J. D.; Hesselberth, P. E.; Richard, A. M.; Michael, A. S.; Dieter, H. K.; Robert, F. B.; Keith, V. W., J. Biomol. Screening 2005, 10 (2), 137-148.
 Leach, F. (1981) J Appl Biochem 3, 473
 de Rautlin de la Roy Y, Messedi N, Grollier G, Grignon B. (1991) J Biolumin Chemilumin. 6:193-201.
 Green, M. R.; Sambrook, J. (2012) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.