

X-Shining™ ルシフェラーゼ

10 mg/mL 水溶液(グリセリン含有)

カタログ番号 No. BX174908; L-8093

CAS 番号: 61970-00-1

別 名: 熱安定性ルシフェラーゼ;
安定化ルシフェラーゼ;
組換えホタル・ルシフェラーゼ

保 管: -15°C

10 mg/mL グリセロール水溶液でお届けします。

これは 10,000 回の測定に相当します。

バイオシンズ(Biosynth)社の X-Shining™ルシフェラーゼは北米のホタル *Photuris pennsylvanica* の組換えルシフェラーゼで、遺伝子組み換えによって強い熱安定性、保管安定性を付与されたものです。

ご紹介

ホタル・ルシフェラーゼは特徴的な基質特異性と発光する仕組みがあるモノメリックな酵素です。ルシフェラーゼは Mg^{2+} 、 O_2 、及び ATP の存在下で 2 段階の酸化反応を触媒します。

第 1 段階では、ATP によってルシフェリンが活性化され、反応性のあるルシフェリン無水物が得られます。第 2 段階では、活性化された中間体が酸素と反応し、ジオキセタン遷移体となり、それが分解してオキソルシフェリンと CO_2 になり目に見える光を発します。

ワイルドタイプのホタル・ルシフェラーゼは基質と接触することで最初に光が発生し次第に明るさが減少し 15 秒間で明るさが低いレベルで持続するようになります。この動力学的プロファイルは反応生成物が酵素からゆっくりと離脱することを反映し、初発反応後の限定的なターンオーバーを示しています。¹ 組換えルシフェラーゼは持続発光がより長く続きます。

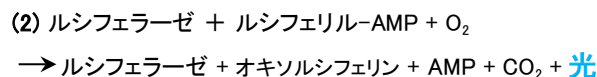
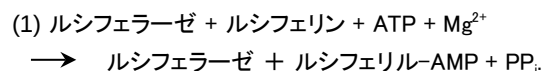


図 1: ルシフェラーゼ生物発光の一般的反応スキーム

アプリケーション

ルシフェリン-ルシフェラーゼ生物発光は多くの臨床診断や試験研究²に使用される感度の高い検出法です。現在では、生物発光法が古くから使われてきた発色法、蛍光法、放射線ラベル法より優れていることが証明されています。例えばイムノアッセイでは、生物発光法は十分な感度を保ちつつ、放射線ラベル法より安全で使いやすいことから完全に生物発光法に置き換わっています。蛍光検出法も一般的に感度、選択性、バックグラウンドのノイズが低いなどの点から、生物発光法に先を越されています。

熱安定性 X-Shining™ルシフェラーゼのようなミュータント・ルシフェラーゼ類はネイティブな D-ルシフェリン (dLuc)にも合成プロ・ルシフェリン類 (ケージ型: caged luciferins)³にも、完全に適しています。

ルーチンのルシフェリン-ルシフェラーゼ試験のための改良アプリケーション

A. ATP 測定

アデノシン三リン酸 (ATP)は生きた細胞内に存在し、エネルギー・バランスに中心的役割を演じています。ATP の細胞内濃度は確実に調節されており、すべての細胞でも同じ濃度レベルが保持されています、細胞が死ぬと ATP は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ています。ATP-依存性ルシフェリン-ルシフェラーゼを用いた物体の表面や液体内の微生物検査法はもはや芸術の域に達しています。

X-Shining™ ルシフェラーゼを用いた ATP 濃度の定量

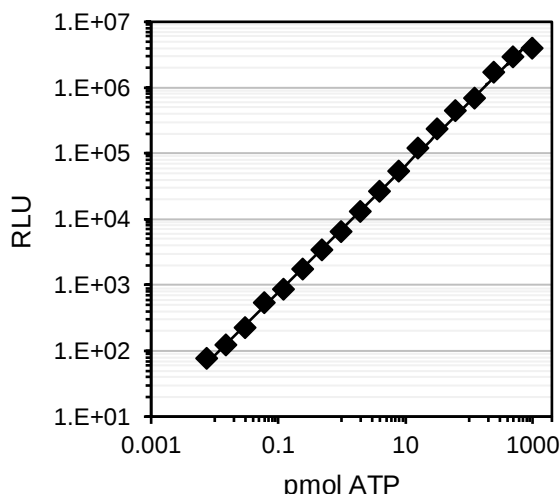


図 2: X-Shining™ ルシフェラーゼによる ATP 標準曲線

弊社の X-Shining™ ルシフェラーゼと D-ルシフェリン (カタログ番号 No. L-8220) を用いて、液量 0.1 mL で 96 穴プレートで試験すると、広い濃度範囲(8 fmol から 1 nmol) の ATP が美しい線形を示します。

B. ルシフェラーゼとプロ・ルシフェリン(ケージ型ルシフェリン)を用いた酵素活性の検出

ルシフェラーゼ生物発光は、D-ルシフェリンまたはアミノルシフェリンを酵素に不安定な基とカップリングさせた基質を用いて、広範な酵素の極めて高感度の活性を測定可能にしました。多くの論文がこれを「ケージ型ルシフェリン」または「プロ・ルシフェリン」と呼んでいます。⁴

例えば、プロ・ルシフェリンは特定グループの細菌の検出に、または動物・植物細胞生物学でレポーター遺伝子アッセイに使用できます。

実際例として、プロ・ルシフェリンを微生物分析に使用することで、細菌酵素の生物発光検出法に新たな道が開けました。はじめに細菌をかなり低い濃度に培養し、続いてプロ・ルシフェリン(発光基質)を加えます。次に、ATP、マグネシウムイオンおよび酸素の存在下で D-ルシフェリンはルシフェラーゼと反応して光を発します。ルシフェラーゼは D-ルシフェリンと低濃度でも反応するので細菌の検出下限を下げることができます。

熱安定性ルシフェラーゼ、弊社の X-Shining™ ルシフェラーゼは、至適温度が 37°C の酵素とルシフェラーゼを並行して使用するアッセイに不可欠です。例えば、プロ・ルシフェリン-β-D-gal (弊社カタログ番号 No. L-8260, Luc-coliforms)を用いた大腸菌の β-ガラクトシダーゼの検出が、それです。

ルシフェリン-β-D-gal と X-Shining™ ルシフェラーゼを用いた β-ガラクトシダーゼの検出

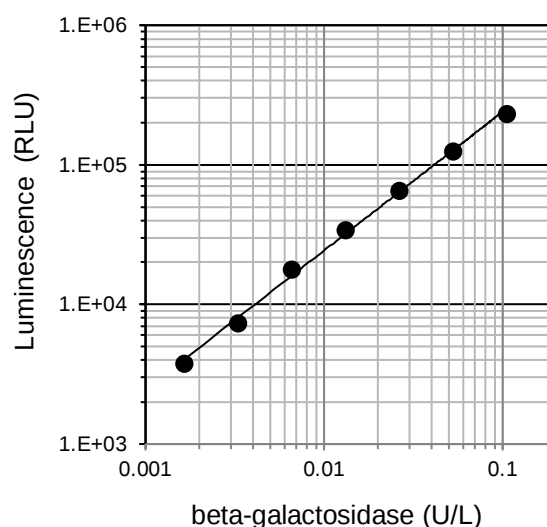


図 3: X-Shining™ ルシフェラーゼを用いた β-ガラクトシダーゼの標準曲線

この例では、一連の濃度の β-ガラクトシダーゼを 2 種の反応をカップルさせて測定しました。

第一段階ではルシフェリン-ガラクトシドを β-ガラクトシダーゼの基質として使用します。その反応で生じたルシフェリンは、次の段階でルシフェラーゼと反応します。生物発光のシグナルは β-ガラクトシダーゼの濃度によって線形に相関します。

使用方法

A. ATP 測定

ルシフェラーゼによる ATP 測定法は、サンプリング、試料のリシスや希釈などの前処理と発光測定から成ります。ATP の正確な測定のために、事前に各種の濃度の ATP をあらかじめ測定して、それと試料の発光光度を比較します。

試薬液の調製

A.1. D-ルシフェリン, カリウム塩, 10 mM ストック液

31.8 mg のホタル D-ルシフェリン・カリウム塩(弊社カタログ番号 No. [L-8230](#)) を 10 mL の超純水に溶かします。

A.2. ATP 測定のためのルシフェラーゼ・アッセイ・バッファー

組成:

トリス(ヒドロキシメチル)-アミノメタン, 50 mM,	6.1 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O, 10 mM,	2.47 g/L
牛血清アルブミン,	2.0 g/L
D/L -システイン, 6 mM,	1.06 g/L
エチレンジアミンテトラ酢酸, 1 mM,	0.37 g/L
ピロリン酸 Na ₄ 塩・10 水和物, 20 μM,	9 mg/L

細胞のリシスに臭化ドデシルトリメチルアンモニウムのような試薬を使用する場合は、 α -シクロデキストリンを 8 g/L の濃度で加えること。

pH を酢酸で 7.8 に調整、ろ過滅菌し 4°C で保管。

A.3. X-Shining™ ルシフェラーゼ・ワーキング液

A.2. のルシフェラーゼ・アッセイ・バッファー 1 mL に X-Shining™ ルシフェラーゼ (L-8093) を 0.1 ~ 1 μL 加えます。

その溶液を使用前までに室温になるようにします。

より長く保管するためには、その溶液を孔径 0.2 μm のフィルターでろ過滅菌する。

その溶液の安定性

ろ過滅菌したアッセイ・バッファー中の X-Shining™ ルシフェラーゼは室温で少なくとも 3 週間は安定です。

A.4. ATP アッセイ・混液

ATP アッセイ・混液はその都度、新たに調製します。つまり、A.3. X-Shining™ ルシフェラーゼ・ワーキング液 0.985 mL に A.1. 10 mM D-ルシフェリン・ストック液 15 μL を混合します。

細胞のリシス (それが必要な場合)

微生物細胞を含む試料液と 2% w/v ドデシルトリメチルアンモニウム・ブロマイド (DTAB) 超純水溶液とを体積比 1 対 9 で混合し、それを 20-25°C で 10-30 分間、静置します。

試料液が真核生物細胞の場合は、試料液と 10% w/v トリトン X-100 超純水溶液とを体積比 1 対 9 で混合し、それをアイス・バスで 10-30 分間、静置します。

ATP の発光測定:

試料 5 μL を A.4. ATP アッセイ・混液 95 μL に加えることで発光反応が始まります。

最高感度を示す開始 10 秒後の RLU 値の平均値を求めます。

B. プロ・ルシフェリン類を用いた酵素活性の測定

酵素活性も試料液、プロ・ルシフェリン基質及びルシフェラーゼを含む反応液で測定できます。試料中の酵素活性を正確に測定するためには、一連の酵素濃度を同一反応条件で測定します。試料の発光シグナルを各種酵素濃度の発光と比較して判断します。

試薬液の調製

B.1. プロ・ルシフェリン 20 mM ストック液

プロ・ルシフェリンを最終濃度 20 mM になるようにジメチルホルムアミド(DMF)またはジメチルスルホキシド(DMSO)に溶かし、-20°C で保管します。

B.2. ATP 100 mM ストック液

57 mg のアデノシン-5'-三リン酸三ナトリウム塩を 1 mL の超純水に溶かし、-20°C で保管します。

B.3. プロ・ルシフェリン・アッセイのためのルシフェラーゼ・アッセイ・バッファー

組成:

トリス(ヒドロキシメチル)-アミノメタン, 50 mM,	6.1 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O, 10 mM,	2.47 g/L
牛血清アルブミン,	2.0 g/L
D/L- システイン, 6 mM,	1.06 g/L
エチレンジアミンテトラ酢酸, 1 mM,	0.37 g/L
ピロリン酸 Na ₄ 塩・10 水和物, 20 μM,	9 mg/L

細胞のリシスに臭化ドデシルトリメチルアンモニウムのような試薬を使用する場合は、α-シクロデキストリンを 8 g/L の濃度で加えること。

pH を酢酸で 7.8 に調整、ろ過滅菌し 4°C で保管。

B.4. X-Shining™ ルシフェラーゼ・ワーキング液

B.2. のルシフェラーゼ・アッセイ・バッファー 1 mL に X-Shining™ ルシフェラーゼ (L-8093) を 0.1 ~ 1 μL 加えます。

その溶液を使用前までに室温になるようにします。

より長く保管するためには、その溶液を孔径 0.2 μm のフィルターでろ過滅菌します。

その溶液の安定性

ろ過滅菌したアッセイ・バッファー中の X-Shining™ ルシフェラーゼは室温で少なくとも 3 週間は安定です。

細胞のリシス

微生物細胞を含む試料液と 2% w/v ドデシルトリメチルアンモニウム・ブロマイド(DTAB)超純水溶液とを体積比 1 対 9 で混合し、それを 20-25°C で 10-30 分間、静置します。

試料液が真核生物細胞の場合は、試料液と 10% w/v トリトン X-100 超純水溶液とを体積比 1 対 9 で混合し、それをアイス・バスで 10-30 分間、静置します。

B.5. プロ・ルシフェリン・アッセイ混液

X-Shining™ ルシフェラーゼ・ワーキング液(B.4.)を 985 μL、プロ・ルシフェリン 20 mM ストック液(B.1.)を 5 μL、および ATP 100 mM ストック液(B.2.)を 10 μL を混合します。

キュベット中の発光の測定

試料 50 μL (例:細胞リシス液)をキュベットに入れ、次にそれにプロルシフェラーゼ・アッセイ混液(B.5) 950 μL を入れ、測定したい酵素の至適温度で直ちに発光を記録し始めます。

96 穴マイクロプレートでの発光の測定

95 または 190 μL の測定混液 (ルシフェラーゼ、ルシフェリンまたはプロ・ルシフェリン、および必要ならば ATP を含む)を白色のマイクロタイタープレートのウェルに入れ、5 または 10 μL の試料を加えてよく混ぜます。白色マイクロタイタープレートのご使用をお勧めします。

室温(20-23°C)またはプロ・ルシフェリンで測定する酵素の至適温度での発光の記録を直ちに始めます。500 msec のインテグレーション時間で、エンドポイントのまたは 3~30 分間の反応速度を測定します。

技術情報

発光スペクトル

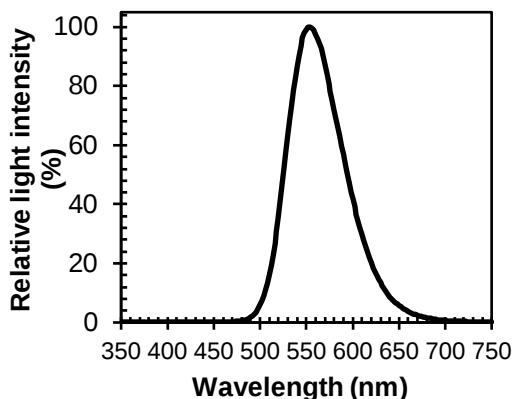


図. 4. X-Shining™ ルシフェラーゼ発光スペクトル.

D-ルシフェリンと X-Shining™ ルシフェラーゼの pH 7.8 での最大波長を示す波長は 560 nm です。これは市販されているホタル(*Photinus pyralis*)のワイルドタイプのルシフェラーゼと同様です。

熱安定性

活性(発光)の減少を X-Shining™ ルシフェラーゼと市販のホタル(*Photinus pyralis*)のワイルドタイプ・ルシフェラーゼについて比較しました。

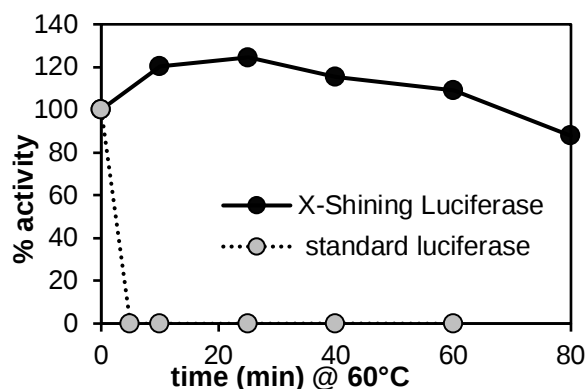


図. 5. X-Shining™ ルシフェラーゼとワイルドタイプルシフェラーゼの 60° C での熱安定性の比較。

X-Shining™ ルシフェラーゼの活性は 60°C で 60 分間完全に保持されました。一方、通常のルシフェラーゼは 10 分後には完全に不活性となりました。

弊社の X-Shining™ ルシフェラーゼの著しい熱安定性の意味するところは、現場試験にあっても試験室での試験でも氷で冷却する必要がないことです。X-Shining™ ルシフェラーゼ・ワーキング液は室温で数週間静置しても活性の減少がなくご使用になれます。

X-Shining™ ルシフェラーゼと通常のルシフェラーゼの発光シグナルの安定性の比較

両者の室温での光シグナルの減衰を並行して、ATP を 0.4 μM、D-ルシフェリン (弊社カタログ番号 No. L-8220) を 0.15 mM 入れてアッセイ・バッファー pH 7.8 で測定しました。発光シグナルは ATP とルシフェリンの投下直後に測定を開始しました。

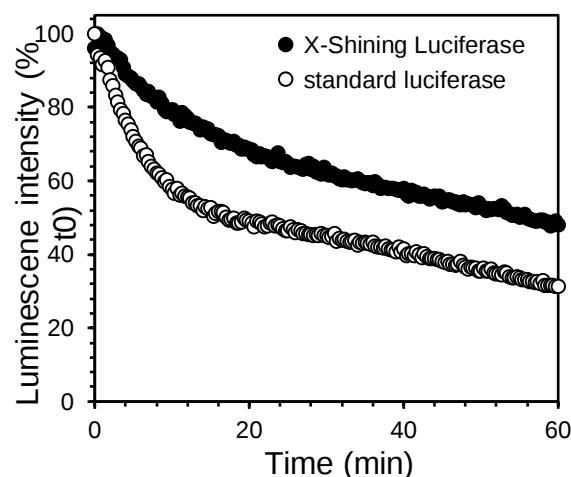


図. 6. アッセイ中の発光シグナルの安定性.

X-Shining™ ルシフェラーゼの性能を標準的なワイルドタイプのルシフェラーゼと比較した。

発光シグナルの安定性はホタルのワイルドタイプルシフェラーゼに比べてかなり増加しています。それゆえ測定のタイムポイントはワイルドタイプルシフェラーゼの場合ほど重要ではありません。

X-Shining™ ルシフェラーゼの性能はルーチンの ATP モニタリングに正確な結果をもたらします。

ミカエリス-メンテン動力学

酵素活性は基質の低濃度から高濃度にかけて典型的な飽和曲線になります。これはミカエリス-メンテン式で表されます。

X-Shining[™] ルシフェラーゼの発光強度を一定の D-ルシフェリン飽和濃度の下に、ATP 濃度をいろいろ変えて測定しました。また、ATP 濃度を一定にして D-ルシフェリン濃度をいろいろ変えて測定しました。

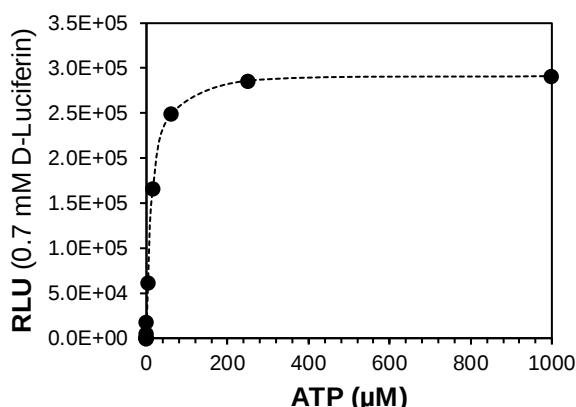


図. 7a. ATP に対する X-Shining[™] ルシフェラーゼ活性の線形の範囲は約 20 μM で終わり (最大活性の半分の活性を与える基質濃度: K_m 値は 13 μM ATP) で最大活性は 250 μM ATP となります。

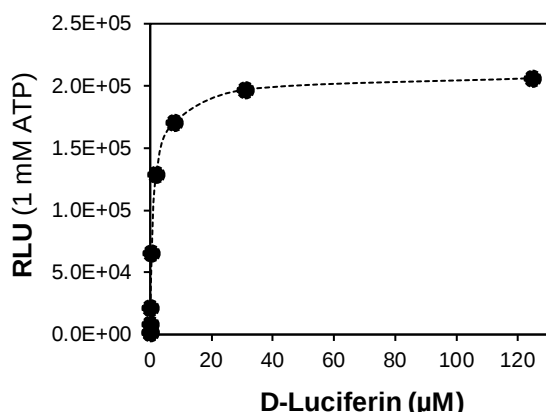


図. 7b. D-ルシフェリンに対する活性は 2 μM まで線形に増加し (最大活性の半分の活性を与える基質濃度: K_m 値は 1.4 μM D-ルシフェリン) で最大活性は 50 μM D-ルシフェリンとなります。

参考文献

1. Green, M. R.; Sambrook, J. (2012) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
2. McCapra, F., Q. Rev., *Chem. Soc.* 1966, **20** (4), 485-510.
3. (a) Kaskova, Z. M.; Tsarkova, A. S.; Yampolsky, I. V., *Chem. Soc. Rev.* 2016, **45** (21), 6048-6077; (b) Rathbun, C. M.; Prescher, J. A., *Biochemistry* 2017, **56** (39), 5178-5184.
4. (a) 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; (b) Monsees, T.; Miska, W.; Geiger, R., *Anal. Biochem.* 1994, **221** (2), 329-334; (c) 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.

関連する弊社の製品

Luciferin, pro-luciferins and ATP:

D-Luciferin Firefly, potassium salt - Endotoxin-free, L-8221, CAS [115144-35-9]

D-Luciferin Firefly, sodium salt monohydrate - Endotoxin-free, L-8241, CAS [103404-75-7]

D-Luciferin free acid, FL08607, CAS [2591-17-5]

D-Luciferin potassium salt, FL08608, CAS [115144-35-9]

D-Luciferin sodium salt, FL08609, CAS [103404-75-7]

D-Luciferin-6-O β-D-galactopyranoside, EL28834, CAS [131474-38-9]

D-Luciferin-6-O β-D-glucopyranoside, EL08610

D-Luciferin-6-O N-acetylneuraminic acid, EL29060

Luciferin-β-D-glucuronide, dipotassium salt, L-8122

Luc-Salmonella (D-Luciferin caprylate), L-8281

Luc-B.cereus Na (D-Luciferin-6-O-cholin phosphate sodium), L-8275

Luciferin-myo-inositol-1-phosphate, sodium salt, L-8120

ATP · 2Na; Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate, NA00135, CAS [34369-07-8]