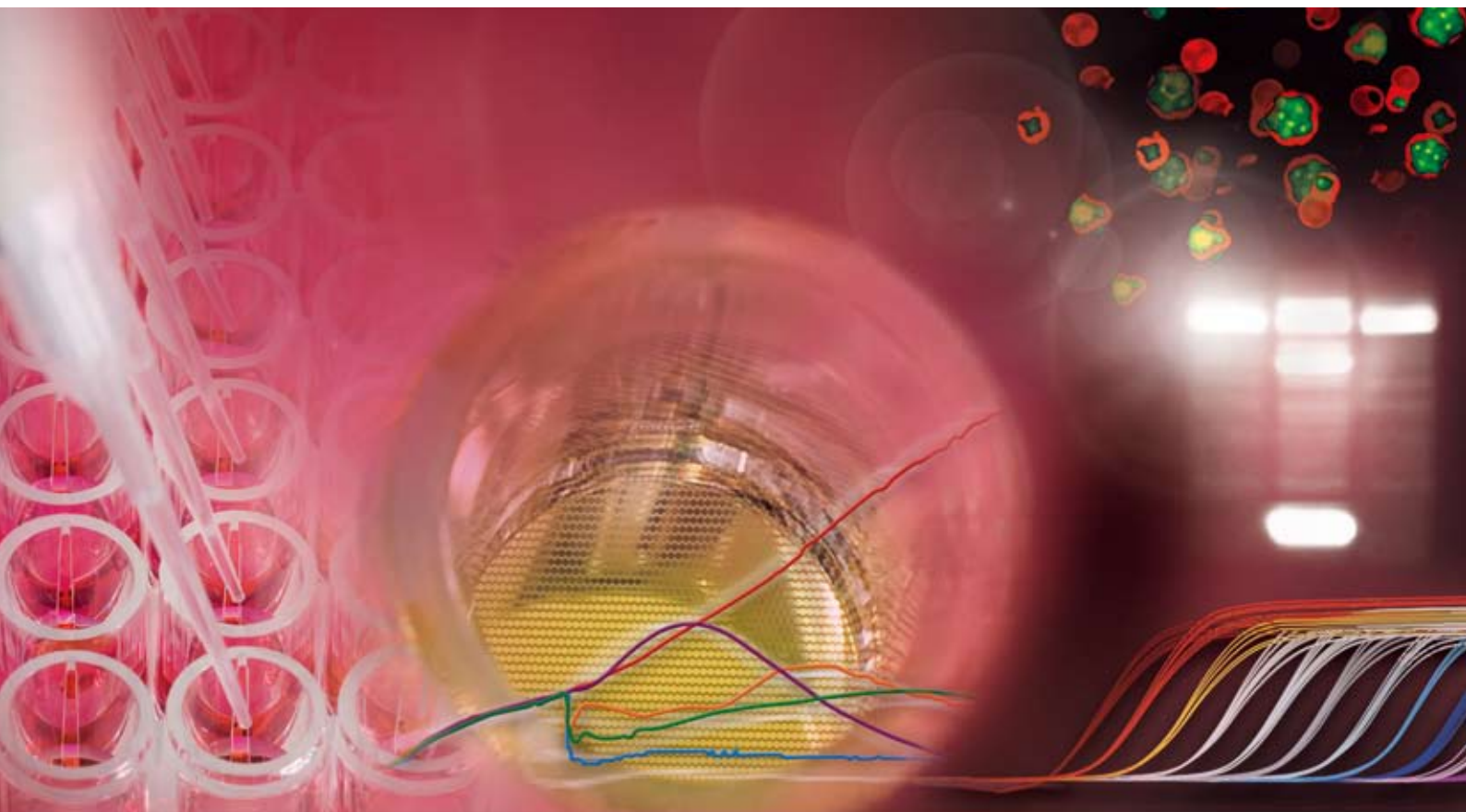


# Cell Analysis ワークフローガイド

細胞の機能解析をより価値あるものに



## 完全な細胞解析ワークフローのためのソリューション

当社の細胞解析用最新製品を新しい真実の発見にお役立てください。ロシュ・ダイアグノスティックスは、生理学的にも信頼性のあるデータが取得できる最適リアルタイム細胞解析システム *xCELLigence* とリアルタイム PCR システム *LightCycler*<sup>®</sup> の両者をご提供しているマーケットリーダーです。

核酸の抽出や精製から、*xCELLigence* システムによるラベルフリーのリアルタイム細胞モニタリング *RealTime ready Focus Panels* による遺伝子発現研究まで、ロシュ・ダイアグノスティックスはすべてのステップにおいてお役立ていただける製品をご提供しています。

### 製品選択ガイド

アプリケーションはお決まりですか？  
製品選択ガイドでは、それぞれのステップに最適な製品が簡単に見つけられます。

### 製品情報

選択ガイドから製品情報、実験のプロトコルやオンラインの情報を含むページに簡単にアクセスできます。

### 完全なサンプルマネージメントのワークフロー

このパンフレットでは、“代表的なワークフローを行った実験ノート”を掲載しています。これらの実験ノートは、1つの研究におけるすべての工程を網羅しており、プラスミドの調製(6ページ)からスタートしてタンパク質発現(23ページ)までを掲載しています。また、実験の一例は、“細胞解析アプリケーション No. 1”でもご覧いただけます。

### オンラインでのより詳しい情報のご提供

細胞解析専用サイト([www.cell-analysis.roche.com](http://www.cell-analysis.roche.com))では、より詳細な製品情報や、プロトコル、アプリケーションノートをはじめ、当社の製品を使用した論文情報などをご提供しています。

細胞解析ワークフローに関する当社製品の詳細は以下の専用サイトをご参照ください：

[www.cell-analysis.roche.com](http://www.cell-analysis.roche.com)

### 国際的なサポートネットワーク

世界中に広がる当社のネットワークを活かし、全世界から情報を収集しています。  
当社で収集した情報が、お客様の細胞解析に必要とされる最適なソリューションやワークフローを見出すための一助となりましたら幸いです。

## パンフレットのご利用方法

すべての細胞解析ワークフローについて、以下のようにステップごとに6章で構成されています。  
また、次のページからは、各ステップにおける製品選択ガイドを掲載しています。

### ステップ 1

#### 核酸と細胞の調製

P.6-7

高純度の酵素によるダメージの少ない細胞の採取や、高品質な遺伝子コンストラクトの精製により、生理学的に信頼できる発現データの取得を実現します。

### ステップ 2

#### DNA や siRNA のトランスフェクション

P.8-9

オフターゲット効果を最小限として、細胞に効率的にトランスフェクトし、細胞の品質を損なうことなく安定したトランスフェクションを実現します。

### ステップ 3

#### 細胞のモニタリング

P.10-13

xCELLigence システムにより、外部標識を用いることなく、リアルタイムで細胞応答を測定します。

#### 機能アッセイの実行

細胞増殖、生存活性、障害性、アポトーシス、細胞死を検出および定量化します。

ステップ 4

P.14-17

#### 遺伝子発現の検証

Ready-to-use のアッセイプレート、カスタマイズ可能なオンライン上での PCR プローブデザイン、そして最新鋭のリアルタイム PCR 装置で、遺伝子発現レベルを迅速かつ簡単に定量化します。

ステップ 5

P.18-20

#### タンパク質発現の検証

発現タンパク質を保護し、安定化させることで、信頼性が高く迅速かつ正確にタンパク質発現を定量化します。

ステップ 6

P.21-23

## 製品選択ガイド

細胞機能における遺伝的な背景を理解するには、高品質の核酸精製、効率的なトランスフェクション、機能アッセイの3つの要素が必須です。ロシュ・ダイアグノスティックスはトランスフェクション、リアルタイム細胞モニタリング、機能アッセイ、遺伝子およびタンパク質発現の確認に対して、最適な製品をご提供します。

### 核酸と細胞の調製

#### クローニング

- rAPid DNA デフォス & ライゲーションキット (6ページ)
- rAPid アルカリホスファターゼ (6ページ)

#### プラスミドの精製

- Genopure プラスミドキット (6ページ)

#### 細胞の調製

- リベラーゼ(リサーチグレード) 酵素ブレンド (7ページ)



### トランスフェクション

#### プラスミドのトランスフェクション

- FuGENE® HD トランスフェクション試薬 (8ページ)

#### siRNA のトランスフェクション

- X-tremeGENE siRNA トランスフェクション試薬 (9ページ)

#### ステーブルトランスフェクション細胞の選択

- G-418(溶液) (10ページ)
- ハイグロマイシン B (10ページ)



### 細胞のモニタリング

#### 細胞の品質管理

- マイコプラズマ PCR ELISA (10ページ)
- BM-Cyclin (10ページ)

#### リアルタイム細胞解析

- xCELLigence システム (11ページ)



お客様に必要な製品を細胞解析ワークフローから検索される際は、この選択ガイドをお役立てください。全ワークフローから目的のアプリケーションをお選び頂くと、適切な試薬や機器システムをご参照頂けます。

## 機能アッセイ

### 増殖と生存活性

- 細胞増殖 ELISA、BrdU(発色と化学発光検出)  
(14ページ)
- 細胞増殖試薬 WST-1  
(15ページ)



### 細胞傷害性

- 細胞傷害検出キット<sup>PLUS</sup>(LDH)  
(15ページ)

### アポトーシスと細胞死

- カスパーゼ3 活性アッセイ  
(16ページ)
- アネキシン V-Alexa 568  
(16ページ)
- 細胞死検出 ELISA<sup>PLUS</sup>  
(17ページ)



## 遺伝子発現の検証

### リアルタイム PCR

- RealTime *ready* Focus Panels(アポトーシスと細胞周期)  
(18ページ)
- LightCycler<sup>®</sup> 480システム  
(19ページ)
- Universal ProbeLibrary  
(20ページ)



## タンパク質発現の検証

### タンパク質の安定化

- cOplete プロテアーゼインヒビター  
(21ページ)
- PhosSTOP ホスファターゼインヒビター  
(21ページ)



### ウェスタンブロットティング

- Lumi-Light<sup>PLUS</sup> ウェスタンブロットティング基質とキット  
(22ページ)
- Lumi-Light ウェスタンブロットティング基質  
(22ページ)

### レポータージーンアッセイ

- ルシフェラーゼレポータージーンアッセイ  
(23ページ)
- SEAP レポータージーンアッセイ  
(23ページ)



# 高品質の核酸から始める トランスフェクション細胞の有意義な細胞解析

## 操作時間の削減とクローニング効率の向上

### rAPid DNA デフォス & ライゲーションキット

粘着、平滑末端 DNA 断片どちらであっても、ラピッド DNA デフォス & ライゲーションキットは、迅速かつ効率的な脱リン酸化とライゲーションが可能です。

- **脱リン酸化に10分、ライゲーションに5分だけ**  
操作が簡単な上に、時間が節約できます。
- **室温でライゲーションを実行可能**  
制限酵素で消化した断片を直接脱リン酸化できます。

### rAPid アルカリホスファターゼ

タンパク質および DNA と RNA の5' 末端を迅速かつ効率よく脱リン酸化するために、rAPid アルカリホスファターゼをご利用ください。酵素の完全な不活化に必要な作業は、75°C 2分間の反応チューブの加熱だけです。

- **コンタミネーションのリスクを削減**  
高純度の精製と厳密な品質チェックを行っているリコンビナント酵素です。
- **安定性抜群**  
他のアルカリホスファターゼと比較して、保存時においても優れた安定性を提供します。

| 製品名                                  | 製品番号      | 包装単位    | 希望販売価格<br>(税抜) |
|--------------------------------------|-----------|---------|----------------|
| rAPid DNA<br>デフォス&<br>ライゲーション<br>キット | 4 898 117 | 40回反応   | ¥24,200        |
|                                      | 4 898 125 | 160回反応  | ¥71,400        |
| rAPid<br>アルカリ<br>ホスファターゼ             | 4 898 133 | 1,000 U | ¥15,800        |
|                                      | 4 898 141 | 5,000 U | ¥52,500        |

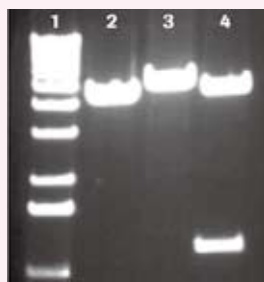
### Genopure プラスミドキット

FuGENE® HD トランスフェクション試薬でも他のトランスフェクション試薬でも使用できる、高濃度、高品質のプラスミド DNA 精製用に、2種類の Genopure プラスミドキットをご用意しています。Genopure プラスミドミディキットで 100µg までの精製プラスミド DNA、または Genopure プラスミドマキシキットで 500µg までの精製プラスミド DNA を調製できます。改良アルカリ溶解プロトコルを用いており、高コピーから低コピー数までの高純度なプラスミドが精製できます。

- **精製時間を大幅に削減**  
セルデブリス除去において、ろ過フィルターを採用しました。時間のかかる遠心などの作業を省けるため、精製時間を節約できます。
- **高純度精製**  
再現性が高く、細菌成分および RNA 汚染の無いプラスミド DNA が得られます(図1)。

#### 代表的なワークフロー実験 パート1:

Genopure による真核細胞トランスフェクション用のプラスミド DNA の調製



◀ **図1: Genopure プラスミドマキシキットを使用した調製。** 3種類の真核性発現ベクターを *E. coli* から精製しました。分子量マーカー(レーン1)、*Eco* RI(レーン2と3)、*Pst* I/*Bgl* II(レーン4)による制限酵素処理後のアガロースゲル電気泳動では、不純物や余分なバンドを示しませんでした。実験の詳細は、“細胞解析アプリケーションノート No.1”にも掲載されています。データは、ドイツのキール大学、S.Adam 氏のご厚意により提供されました。

| 製品名                                     | 製品番号      | 包装単位                               | 希望販売価格<br>(税抜) |
|---|-----------|------------------------------------|----------------|
| Genopure プラスミド<br>ミディキット                | 3 143 414 | 1キット<br>(20回まで調製)                  | ¥17,900        |
| Genopure プラスミド<br>マキシキット                | 3 143 422 | 1キット<br>(10回まで調製)                  | ¥18,900        |
| 低コピー数<br>プラスミド用<br>Genopure<br>バッファーセット | 4 634 772 | 1セット<br>(20回/マキシキット<br>60回/ミディキット) | ¥20,000        |

# 組織の分散とより多くの生細胞の採取

## 初代細胞をより多く取得するために

### リパーゼ リサーチグレード酵素ブレンド

リパーゼ リサーチグレード酵素ブレンドを使用して、細胞の分散処理効率を向上しませんか? 新しく開発されたコラゲナーゼ I/II 製造プロセスとリパーゼ酵素テクノロジーの採用で、素晴らしい性能をもつ次世代の製品となりました。様々な組織から初代細胞を分散させるために、最適に調節された酵素の混和の程度により、様々な (TL、TM、TH、DL、DH) 製品をご用意しています。

#### ■ 分離細胞の生存活性と収量の向上

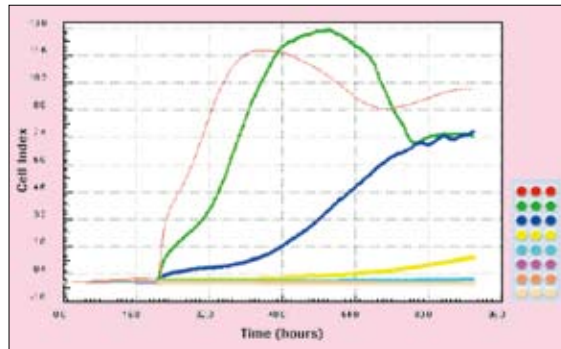
クロストリパイン活性とトリプシン活性を減少させました。

#### ■ 実験再現性の向上

ロット間の均一性を高めました。

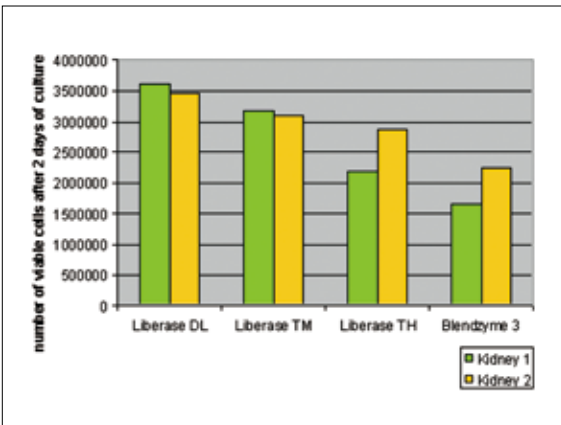
#### ■ 分離細胞への汚染の危険性が顕著に減少

リパーゼ酵素ブレンドは、ほ乳類および鳥類由来の成分を含んでいません。



▲図3: 様々なリパーゼ酵素ブレンドで分散させた初代腎臓細胞の増殖の差異。

このデータは、xCELLigence システムを使用して電気的なインピーダンスを測定し、2-8日間の培養中に得られたリアルタイムセルインデックス(CI)を示しています。例えば、赤色線はリパーゼリサーチグレード酵素ブレンド TM (高純度に精製されたコラゲナーゼ I と II のブレンドに中程度の濃度の精製サモライシンを含有) を用いて腎臓から分散された初代ネフロサイトの素早い増殖を示しています。この場合では、50,000個の初代ネフロサイトから開始して、2倍の希釈系列を3重に播種しています。xCELLigence RTCA SP インストゥルメントと E-Plate 96 を使用した連続的なラベルフリーの細胞モニタリングは、リパーゼリサーチグレード TM を用いて腎臓から分散された細胞の、高い生存活性と至適な増殖を示唆しています。



▲図2: 細胞の回収量。

リパーゼ リサーチグレード (DL、TM、TH) を使用して、初代ネフロサイト (濾過細胞) をブタ腎臓より単離しました。トリパンブルー染色を使用して、生細胞の数を培養の2日後に測定しました。旧製品であるリパーゼブレンドザイム3と比較して、用いたすべての新しいリパーゼ精製酵素ブレンドは細胞数の増加を示しています。これは2回の分散実験の結果を示しています。

### リパーゼ選択ガイド

| リパーゼ<br>組織のタイプ | TL | TM | TH | DL | DH |
|----------------|----|----|----|----|----|
| 肝臓             |    | ✓  |    |    | ✓  |
| 腎臓             |    | ✓  |    |    |    |
| 皮膚             |    |    |    |    | ✓  |
| 心臓             |    | ✓  | ✓  |    | ✓  |
| 脾臓 (脾島)        | ✓  |    |    | ✓  |    |

注記: この選択ガイドはあくまでも一般的なガイドラインです。ご目的に合った製品を選択するには、生物種や目的の細胞タイプなどの判断基準を十分に考慮して頂く必要があります。最良な結果を得るために、リパーゼリサーチグレード選択セットを使用して、それぞれのアプリケーションに最適な酵素ブレンドをお試しください。

リパーゼ リサーチグレードの詳細情報は、専用サイト:  
[www.collagenase.com](http://www.collagenase.com) をご参照ください。

| 製品名                   | 製品番号      | 包装単位   | 希望販売価格<br>(税抜) |
|-----------------------|-----------|--------|----------------|
| リパーゼリサーチ<br>グレード選択キット | 5 401 046 | 5×5 mg | ¥31,800        |

核酸と細胞の  
調製

# トランスフェクションによる悪影響をうけない 遺伝子の機能解析

## 高いトランスフェクション効率の導入で 試薬が誘発するオフターゲット効果を避けましょう

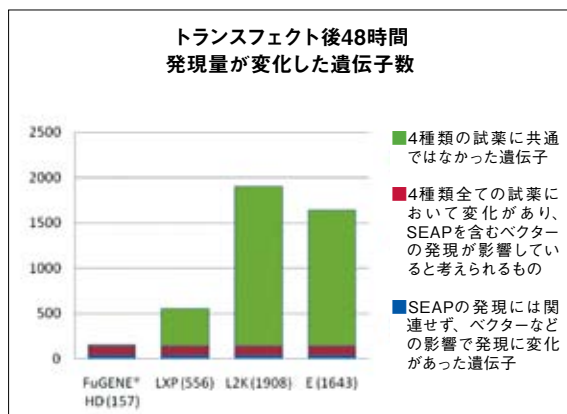
### FuGENE® HD トランスフェクション試薬

真核細胞株や初代細胞のトランスフェクションには、成功実績のあるノンリポソーマルなFuGENE® HDトランスフェクション試薬をご利用ください(図4)。

- **本当に価値あるデータの取得**  
遺伝子発現解析において、試薬自体が誘導してしまう発現変化を最小限にすることができます。
- **高い細胞の生存率**  
フィルター滅菌済みで動物由来成分を含まず、細胞毒性が非常に低いため、生存率が向上します。
- **高いトランスフェクション効率**  
他の試薬では満足にトランスフェクトできない多くの細胞において、高いトランスフェクション効率を実現します。

トランスフェクションに成功した細胞のデータベースはこちらをご参照ください。

[www.powerful-transfection.com](http://www.powerful-transfection.com)



▲図5: FuGENE® HD トランスフェクション試薬を用いてトランスフェクトされた細胞は、オフターゲット効果が極わずかで、生理学的に信頼性のある発現データを得られました。

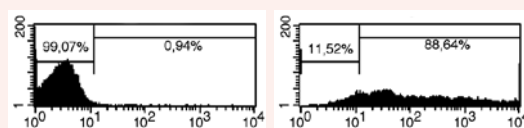
ヒストグラムは、4種類のトランスフェクション試薬を使用して発現差異が見られた遺伝子の数を表しています。MCF7細胞にレポーター遺伝子(SEAP)を含むベクターをトランスフェクトした48時間後のデータです。転写産物の総数はトランスフェクション試薬の後の括弧内に示しています。

詳細は、下記文献をご覧ください。

“Transcriptional Effects of Transfection: The Potential for Misinterpretation of Gene Expression Data Generated from Transiently Transfected Cells”, Jacobsen *et al.* (2009)

### 代表的なワークフロー実験 パート2:

FuGENE® HD トランスフェクション試薬\*を使用したGFPおよびカスパーゼ-8発現プラスミドのトランスフェクション



▲図4: GFPの発現解析。

トランスフェクション効率を最適化するために、FuGENE® HDトランスフェクション試薬を使用してHeLa細胞(ATCC® CCL-2™)に緑色蛍光タンパク質(GFP)発現ベクターをトランスフェクトしました。細胞を、FACSCaliburフローサイトメーター(BD Biosciences)(A)とレーザー走査顕微鏡(B)で分析を行いました。GFP発現細胞のフローサイトメトリーは、非常に高いトランスフェクション効率を示しました。トランスフェクトされたpRK-GFP細胞の88%以上はGFP陽性でした。それに加え、細胞核の可視化のために、DAPIで染色後、レーザー走査顕微鏡を用いました。細胞の60~70%は、極めて強いGFP陽性でした。実験の詳細につきましては、“細胞解析アプリケーションノート No. 1”をご覧ください。

本データは、ドイツのキール大学、S.Adam氏のご厚意により提供されました。



FuGENE® HDパンフレット

下記URLより資料をご請求ください。  
<http://www. Roche-biochem.jp/prima/index.html>

# 信頼できる有意義なジーンノックダウンデータの作成 実験データの生理学的な信頼性を高めましょう

## X-tremeGENE siRNA トランスフェクション試薬

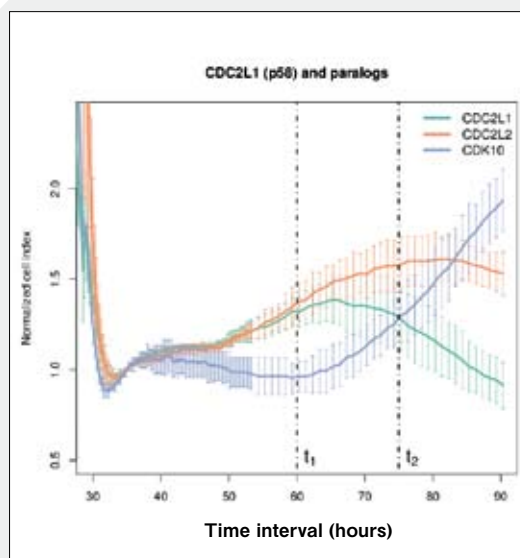
動物細胞に効率的に siRNA を導入し、遺伝子サイレンシングを誘導するために、X-tremeGENE siRNA トランスフェクション試薬をお役立てください(図6)。この試薬は、siRNA 単体や siRNA とプラスミド DNA の混合物とのコンプレックスを形成するために最適化された、脂質ベースのトランスフェクション試薬です。

- **多くの種類の細胞で遺伝子サイレンシングを達成**  
HT29などのトランスフェクションの困難な細胞を含め、多くの実績があります。
- **この試薬だけで対応可能**  
siRNA とコトランスフェクションをベースとする遺伝子ノックダウン実験に、この試薬のみで対応できます。
- **試薬による細胞毒性が極めて低い**  
観察された細胞への効果がトランスフェクトした siRNA のみによることを保証できます。

詳細については、下記サイトをご参照ください。

[www.powerful-transfection.com](http://www.powerful-transfection.com)

| 製品名                              | 製品番号      | 包装単位     | 希望販売価格<br>(税抜) |
|----------------------------------|-----------|----------|----------------|
| FuGENE® HD<br>トランスフェクション試薬       | 4 709 691 | 0.4 ml   | ¥29,800        |
|                                  | 4 709 705 | 1 ml     | ¥62,800        |
|                                  | 4 709 713 | 5×1 ml   | ¥252,000       |
| X-tremeGENE<br>siRNAトランスフェクション試薬 | 4 476 093 | 1 ml     | ¥23,600        |
|                                  | 4 476 115 | 5 x 1 ml | ¥94,300        |



▲ 図6: X-tremeGENE siRNA トランスフェクション試薬を使用したキナーゼ遺伝子の siRNA ノックダウン。

X-tremeGENE siRNA トランスフェクション試薬を使用して CDC2L1 と CDC2L2、CDK10 をターゲットとした siRNA をトランスフェクトした48時間後に、xCELLigence システムで HeLa 細胞の増殖を分析しました。任意の時間 (t1、t2) で行ったエンドポイントの増殖アッセイは異なる様々な結論を導きます: t1 で集計したデータは、CDC2L1 は増殖において CDC2L2 と同様の効果を持つが、CDK10 は増殖を抑制することを示唆します。t2 でのデータは CDC2L2 に比べて CDC2L1 と CDK10 の両方が増殖を減少することを示唆しています。しかしながら、これらの結論は xCELLigence を用いた細胞モニタリングにおいて見られる連続的な表現型の変化を十分に捉えられていないことを示唆しております。

このキナーゼ siRNA の記事詳細は2009年の Biochemica No. 2をご覧ください。本稿は xCELLigence 専用サイトから入手できます: [www.xcelligence.roche.com](http://www.xcelligence.roche.com)

トランス  
フェクション

# 細胞を穏やかに取り扱いステータブルな トランスフェクション細胞を選択

## マイコプラズマの検出と除去

## ステータブルなトランスフェクション細胞を維持しましょう

### マイコプラズマ PCR ELISA

マイコプラズマは、細胞培養における一般的でありながら深刻な汚染であり、マイコプラズマ汚染は培養細胞の使用において、生物学的研究で遭遇する大きな問題の1つとなっています。マイコプラズマ PCR ELISA キットは、PCRの利点と使いやすいELISAの特徴を組み合わせることで、広範囲のマイコプラズマ、アコレプラズマおよびウレアプラズマの迅速で超高感度な検出を可能にしました。

#### ■ 1 - 10 fg のマイコプラズマ DNA を検出

反応ごとに約1 - 20遺伝子コピー(少なくとも $10^3$ cfu/ml)に相当するマイコプラズマDNAを検出できます。

#### ■ 作業は簡単

すぐに使用できるミクスチャー試薬であるため、多量のサンプルであっても、迅速かつ容易に取り扱うことができます。

### BM-Cyclin(抗生物質の組み合わせ)

BM-Cyclinは多種多様な細胞タイプから、大きな細胞障害性の影響なくマイコプラズマを除去するのに最適な抗生物質です。BM-Cyclinだけが、実験的に汚染され慢性的に感染した細胞系から、*Acholeplasma laidlawii*、*Mycoplasma arginini*、*Mycoplasma hyorhinitis* および、*Mycoplasma orale* を効果的に除去することが分かっています。これらのマイコプラズマ株は、動物細胞培養において汚染の85%以上を占めています。

### G-418(溶液)

ネオマイシン耐性遺伝子をトランスフェクトした真核細胞を選択・維持する際は、フィルター滅菌済みのG-418抗生物質溶液をご利用ください。

#### ■ 時間と労力を節約

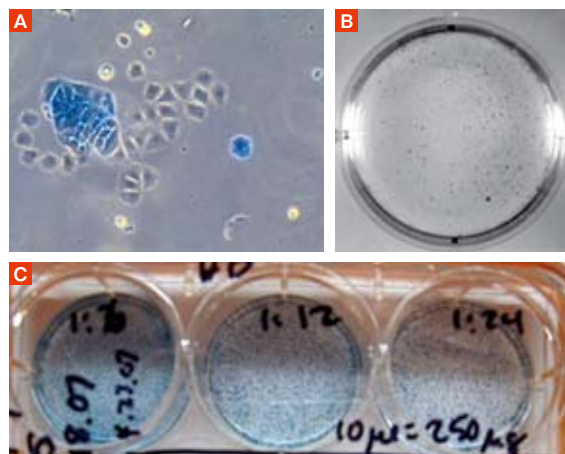
高純度ですぐに使用可能な溶液であり、粉末からストック溶液を調製する時間を節約できます。

#### ■ ロット間差を低減

厳しい機能試験を行っています。

### ハイグロマイシン B

原核、真核細胞のタンパク質合成を阻害する際は、アミノグリコシド系抗生物質をご使用ください。*E. coli* ハイグロマイシン耐性遺伝子(*hyg* または *hph*)を安定的に導入した真核細胞を選択し、維持できます。



▲図7: G-418耐性 MCF7(ATCC® HBT-22™) コロニーの作成。

細胞に FuGENE® HD トランスフェクション試薬を用いて、pXM-lacZ (lac Z 遺伝子とネオマイシン耐性マーカーの両方を含む)をトランスフェクトしました。細胞は G-418(250 $\mu$ g/ml)を含む選択培地で8週間培養しました。

A: 2週間後、 $\beta$ -gal を発現している細胞と、していない細胞がはっきりと観察されます。

B:  $\beta$ -gal を発現している様々なサイズの MCF7コロニーが2週間の培養で観察されます。

C: 8週目に、 $\beta$ -gal を発現している多くの MCF7コロニーが観察されます。

ATCC®

To ensure the quality of cells to be transfected, Roche recommends using freshly-obtained, low-passage cell lines from ATCC®. For more information, please visit and bookmark [www.atcc.org](http://www.atcc.org)

| 製品名   | 製品番号                   | 包装単位                                       | 希望販売価格(税抜)         |
|---|------------------------|--|--------------------|
| マイコプラズマ PCR ELISA キット                                     | 1 663 925              | 1キット (96回反応)                               | ¥89,100            |
| BM-Cyclin   | 799 050                | 37.5 mg (2 $\times$ 2.5 l 培地)              | ¥11,400            |
| G-418溶液   | 4 727 878<br>4 727 894 | 20ml (1g)<br>100ml (5 $\times$ 20ml) (5 g) | ¥13,500<br>¥54,000 |
| ハイグロマイシンB ( <i>Streptomyces hygroscopicus</i> 由来)、フィルター滅菌 | 843 555                | 1g (20 ml)                                 | ¥28,600            |

細胞培養に関する詳細は、“xCELLigence アプリケーションノート No. 7: 動物細胞の培養とモニタリング: 基本的な技術”を参照してください。本稿は [www.xcelligence.roche.com](http://www.xcelligence.roche.com) から入手できます。

# 重要な現象を見逃していませんか？

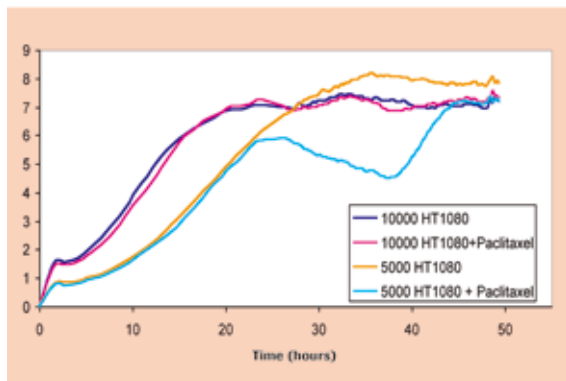
すべての実験で生理学的に信頼性のあるデータをリアルタイムに得ることが出来ます

## xCELLigence システム

xCELLigence システムは標識することなく細胞応答を連続的にモニターします。特別に作成された細胞培養用 E-Plate の底面に集積された微小電極が電気的なインピーダンスの変化を測定し、細胞数、細胞接着、細胞障害性、細胞活性、細胞形態などの細胞の状態に関する精密な定量情報を提供します。

### すべての細胞イベントを見逃がさない

従来の一点だけのエンドポイントアッセイによる分析では通常見逃してしまう細胞応答の測定が可能です。複雑な実験におけるすべてのフェーズで、細胞応答の測定が可能になりました。より詳細なダウンストリーム分析のための実験においてクリティカルなタイムポイントを決定するために、標識を必要としない細胞応答のリアルタイムモニタリングの優位性を是非お試しください。



▲図8：細胞応答の連続的モニタリング。

HT1080細胞を2種類の細胞数(5,000個と10,000個)でE-Plate 96に播種しました。24時間後に、各細胞数(5,000細胞と10,000細胞)の培養の各々1つを12.5 nMのpaclitaxelで処理しました。コントロールとして、両細胞数の培養の残りの各ウェルをDMSOで処理しました。5,000個の細胞を播種したウェルは、次の24時間にわたり、paclitaxelに反応しましたが、10,000個の細胞を播種したウェルとコントロールは反応を見せませんでした。この5,000個の細胞数のウェルにおける、ある一定時間に限られた応答は、50時間後にのみ測定するエンドポイントアッセイでは発見できなかったことに注目してください。

## テクノロジーの優位性

xCELLigence システムは標識物等による標識を必要とせずに、幅広い細胞イベントを連続的かつ非侵襲的に測定します。E-Plate の底面に設置された微小電極に細胞が接触することで、電極 / 溶液面でのイオン環境を変化させ、インピーダンスに影響します。より多くの細胞の電極への接触は電気的なインピーダンスを増加させます。このための専用ソフトウェアがこのセンサーアレイをモニターし、実験のすべての時間において情報をコンスタントに記録します。

### ■細胞応答の連続的なデータプロファイルをリアルタイムに取得

短期(数分)や長期(数日)の時間の制約なく、*in vitro* 実験を行えます。

### ■生理的に信頼性のあるデータの取得

細胞環境を破壊し、侵襲するようなラベリングなどを行うことなく、目的の候補物質の効果を分析可能です。

### ■様々な分析法に対応

分析ソフトウェアはドースレスポンスカーブやIC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>計算、データ補正、スロープ、ダブリングタイムなどを含む多くの分析オプションがあります。

### ■他の実験法と組み合わせて

リアルタイム細胞解析とエンドポイント機能アッセイを組み合わせデータを補完し、実験前、実験中、実験後のデータのクオリティを最大化します。

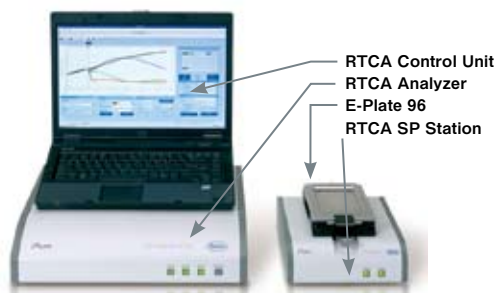
リアルタイムセルアナライザーに関する、より詳細なアプリケーションや情報は、xCELLigence 専用インターネットサイト、[www.xcelligence.roche.com](http://www.xcelligence.roche.com) から入手できます。

# 新しい事実の発見に—あなたにあったスケールを xCELLigence システムは様々なご用途に対応します

お客様の目的に合わせた機器をお選びいただけるよう、xCELLigence リアルタイムセルアナライザーは3タイプの機種をご用意しています。1枚の96ウェル E-Plate を使用する RTCA SP、ハイスループットにも対応可能な6プレートタイプ RTCA MP、16ウェル E-Plate を使用する RTCA DP の中からからお選びください。

## RTCA SP インストゥルメント

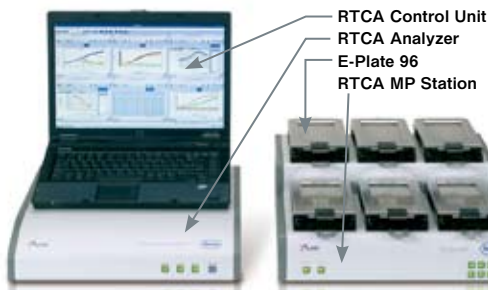
本インストゥルメントは3つのコンポーネントで構成され、96ウェルの E-Plate 96、1枚を測定することが可能です。中程度のスループットのスクリーニングやアッセイの標準化アプリケーションに最適なインストゥルメントです。



▲図9：RTCA SP インストゥルメントは RTCA コントロールユニット、RTCA アナライザー、RTCA SP ステーションで構成されます。

## RTCA MP インストゥルメント

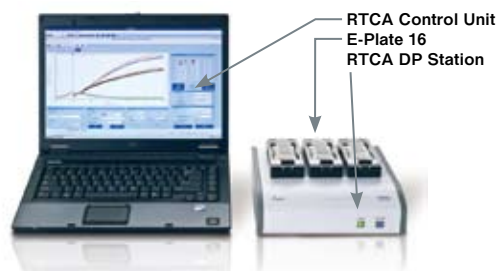
本インストゥルメントは6枚までの E-Plate を同時に測定することができます。また各々独立したコントロールが可能で、最大6人のユーザーが同時に実験を行うことができます。スクリーニングや細胞アッセイの標準化のアプリケーションのための中～高程度のスループットに対応するインストゥルメントとして最適です。



▲図10：RTCA MP インストゥルメントは RTCA コントロールユニット、RTCA アナライザー、RTCA MP ステーションで構成されます。

## RTCA DP インストゥルメント

本インストゥルメントは多数のサンプル測定が必要ない実験系に適しています。このインストゥルメントは2種類の16ウェルタイプのプレートが使用可能です：細胞アッセイのための E-Plate 16、細胞の浸潤・移動アッセイのための CIM-Plate 16。それぞれのプレートを組み合わせることができ、複数ユーザーの使用および各プレートの個別のコントロールなど、3枚までのプレートをサポートします(図11)。



▲図11：RTCA DP インストゥルメントは RTCA コントロールユニット、RTCA アナライザーで構成されています。

## xCELLigence システムのアプリケーション

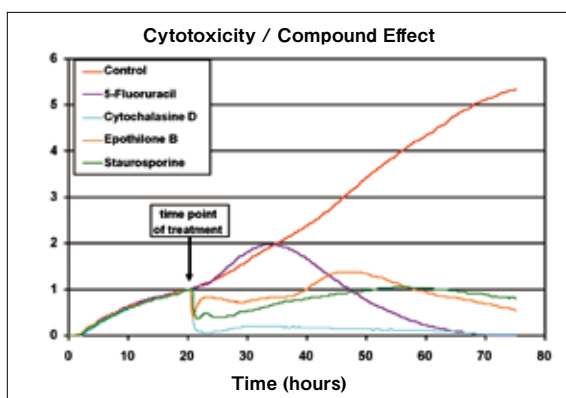
- 細胞の接着と伸展
- 細胞の増殖と分化
- 化学物質や細胞による細胞障害性
- レセプターが介在するシグナル伝達(GPCR、RTK)
- 細胞の品質管理
- ウイルスによる細胞変性効果
- 細胞の浸潤と移動

# リアルタイム細胞モニタリングと その他のアッセイの組み合わせ

より真実に近いデータの取得へ

## インピーダンステクノロジーによる 細胞障害性物質のモニタリング

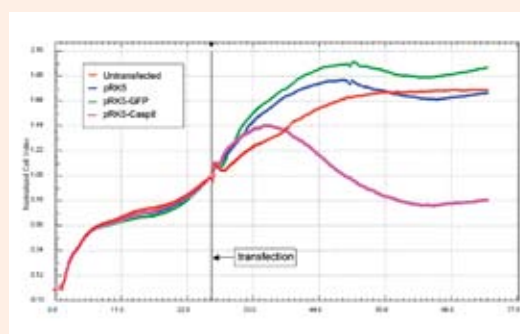
細胞障害性物質を分析する実験は、リアルタイム細胞モニタリングの優位性を明瞭に示唆します(図12)。RTCA インストルメントが取得したデータは作用機序がまだ明らかにされていない新規物質の測定を可能にします(図13)。



▲図12: RTCA インストルメントを使用して測定した物質の細胞障害効果。  
HeLa 細胞を2,000個 / ウェルで播種し、15分毎に20時間モニターし、次に異なる作用機序を持つ様々な物質で処理しました。各成分は、それぞれのタイプや曝露時間に応じて、処理後の75時間にわたり区別可能な細胞応答が測定されました。

## 代表的なワークフロー実験 パート3:

HeLa 細胞でのカスパーゼ-8過剰発現によるアポトーシス誘導のリアルタイム分析。



▲図13: HeLa 細胞を E-Plate 96 に播種し、発現ベクター pRK5、pRK-GFP、pRK-Casp8 でトランスフェクトしました。トランスフェクション後、48時間、セルインデックス(CI)を xCELLigence システムでモニターしました。コントロールベクターである pRK5、pRK-GFP をトランスフェクトした細胞がトランスフェクトしないコントロール細胞と同様に増殖を続けるのに対し、pRK-Casp8 をトランスフェクトした細胞はトランスフェクションの12時間後から大きく CI が減少しました。実験の詳細は、“細胞解析アプリケーションノート No. 1”に掲載しています。データは、ドイツのキール大学、S.Adam 氏のご厚意により提供されました。

## リアルタイム細胞解析の豊富なアプリケーション

リアルタイム細胞モニタリングと他のアッセイとの組み合わせで細胞のより信頼性のあるデータを取得できます。以下の表をご参照ください。

| アプリケーション   | 製品  | 応用例  |
|------------|---|--|
| トランスフェクション | FuGENE® HD トランスフェクション試薬   | 細胞の QC などに使用可能です。コンフルエンスの確認や成長時期の確立などを含む最適なトランスフェクションの時間決定など。              |
|            | X-tremeGENE siRNA トランスフェクション試薬  | siRNA 導入の最適時期の決定、siRNA 効果の検証、siRNA 導入に対する“細胞全体”の応答の発見                      |
| 機能アッセイ     | 細胞増殖アッセイ(細胞増殖試薬 WST-1、細胞増殖 ELISA、BrdU、MTT、XTT)                            | エンドポイントアッセイを行うべき最適な時間の決定、エンドポイント標識が生活性に影響が無いことの確認、増殖と形態変化の間の分別、細胞品質の観察(図6) |
|            | 細胞障害性検出キット <sup>PLUS</sup> (LDH)  | より正確な標的 / エフェクター細胞研究、エンドポイントアッセイを行う最適な時間の選定、形態の変化と細胞障害性の間の分別               |
|            | アポトーシスアッセイ(細胞死検出 ELISA <sup>PLUS</sup> 、カスパーゼ3活性アッセイ、アネキシン V-FLUOS 染色キット) | 細胞死の定量、アポトーシスとネクローシスの判別、細胞死の機構の決定(図18)                                     |
| 遺伝子発現      | RealTime ready Focus Panels   | 形態変化と関連している遺伝子の発見  |

細胞の  
モニタリング

# 細胞の増殖をダイレクトに測定

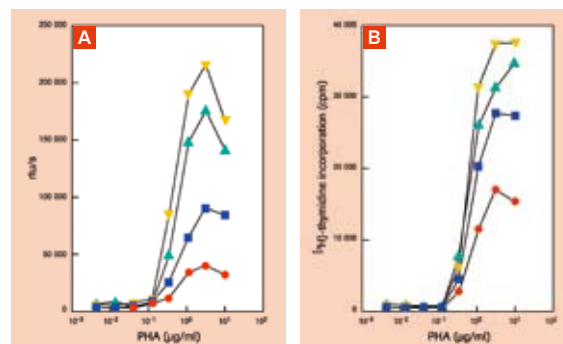
## RIを使用することなく感度を維持

### 細胞増殖 ELISA, BrdU キット(発色と化学発光)

細胞増殖 ELISA, BrdU キット(発色と化学発光)は、増殖している細胞の DNA に取り込まれるチミジンの代わりにそのアナログである5- ブロモ -2- デオキシウリジン (BrdU) が取り込まれることを利用して BrdU を検出しています。この相対的なシグナル強度(図14では、発光強度(rlu/s))は DNA 合成量や増殖細胞数に強く相関します。

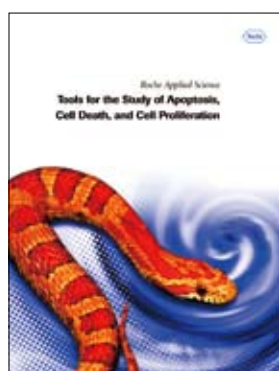
- **増殖細胞数と強く相関するデータを取得**  
簡便な ELISA フォーマットを使用して増殖細胞数と強く相関する結果が容易に得られます(低い平均偏差)。
- **安全に高感度**  
高感度の方法でありながら、被曝の危険性があるアイソトープは使用していません(図14)。
- **キットに含まれる細胞に優しい FixDenat 試薬を使用することで細胞の形態を容易かつ迅速に保存できます。**

アポトーシス、細胞傷害性、細胞増殖の製品の詳細情報が入手できる、[www.roche-applied-science.com/apoptosis](http://www.roche-applied-science.com/apoptosis) を是非ご訪問ください。製品選択ガイドもご参照いただけます。



▲図14:  $[^3\text{H}]$ -チミジン取り込みアッセイと細胞増殖 ELISA, BrdU (化学発光)キットで取得したデータの間には強い相関が得られました。細胞分裂誘起物質で活性化したヒト末梢血リンパ球(PBLs)の増殖を測定するため、PBLsを分離し、マイクロプレート中で48時間培養しました。BrdU(A)または $[^3\text{H}]$ -チミジン(B)を加え、さらに2時間(●)、4時間(■)、8時間(▲)、24時間(▼)インキュベートしました。細胞増殖 ELISA, BrdU (化学発光)キットで得られたデータと、 $[^3\text{H}]$ -チミジン取り込みアッセイ(スタンダードプロトコール)で得られた結果は強く相関しました。

| 製品名                    | 製品番号      | 包装単位               | 希望販売価格<br>(税抜) |
|------------------------|-----------|--------------------|----------------|
| 細胞増殖ELISA, BrdU化学発光キット | 1 669 915 | 1キット<br>(1,000テスト) | ¥74,600        |
| 細胞増殖ELISA, BrdU発色キット   | 1 647 229 | 1キット<br>(1,000テスト) | ¥74,600        |



Tools for the study  
of Apoptosis, Cytotoxicity,  
and Cell Proliferation

下記URLより資料をご請求ください。  
<http://www.roche-biochem.jp/prima/index.html>

# 細胞生存アッセイと細胞障害性アッセイのための強力なツール

迅速で簡便なキットにより、ハイスループットに対応

## 細胞増幅試薬 WST-1

1ステップのみの簡単作業で、発色アッセイを利用した生細胞の代謝活性を定量してみませんか？

### ■従来法と5倍の高感度

MTT や XTT アッセイに比べ、広いダイナミックレンジで5倍の高感度を達成しています。

### ■操作もより簡単に

MTT や XTT、MTS アッセイよりも簡便な ready-to-use 試薬をお試ください。WST-1を細胞を含むウェルに直接加えるだけの簡便さで、不安定な XTT や MTS で必要とされる試薬の用時調製、また MTT に必要な追加の可溶化ステップも必要ありません。

## 細胞障害性検出キット PLUS (LDH)

損傷を受けた細胞から上清中に放出される乳酸脱水素酵素 (LDH)を測定する、Non-RI の発色アッセイプレートです。細胞死と細胞溶解の定量にご使用ください。

### ■ハイスループットアッセイが可能

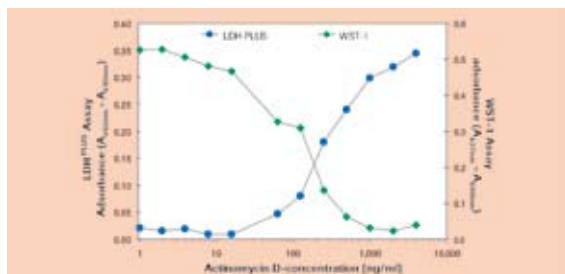
再分注、遠心、前標識などのステップが不要で、操作ステップを大幅に省くことができます。

### ■WST-1アッセイとのコンビネーション

WST-1アッセイとの組み合わせることで、細胞状態のより多くの情報を獲得できます(図16)。

### ■幅広い直線性と高い感度

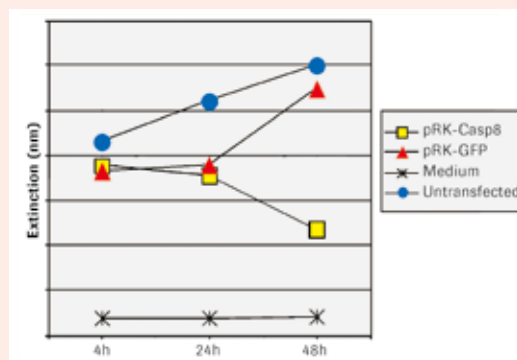
少ない数の細胞(<100個 / ウェル)でも検出可能。



▲ 図16 : U-937細胞における薬剤応答の研究のために細胞障害性検出キット PLUS (LDH)と細胞増殖試薬 WST-1を使用。様々な濃度のアクチノマイシン D が細胞に添加され、その細胞障害性が両キットで測定されました。

## 代表的なワークフロー実験 パート4:

カスパーゼ-8 発現プラスミドをトランスフェクションしたHeLa細胞における細胞内代謝測定のための細胞増殖試薬WST-1の応用\*



▲ 図15 : 細胞増殖試薬 WST-1を使用した細胞内代謝定量。HeLa 細胞(ATCC® CCL-2™)に発現ベクター pRK5、pRK-GFP および pRK-Casp8 をトランスフェクションしました。トランスフェクションの4、24および48時間後に、10μl の細胞増殖試薬 WST-1を各ウェルに添加しました。pRK -Casp8をトランスフェクションした細胞の代謝活性がトランスフェクションの48時間後に大幅に減少することがデータで示され、カスパーゼ-8 の過剰発現は、細胞に対し悪影響があることを示唆しています。  
\*データは、ドイツのキール大学、S.Adam 氏のご厚意により提供されました。

| 製品名                   | 製品番号      | 包装単位           | 希望販売価格 (税抜) |
|-----------------------|-----------|----------------|-------------|
| 細胞増殖試薬 WST-1          | 5 015 944 | 8ml (800テスト)   | ¥15,000     |
|                       | 1 644 807 | 25ml (2500テスト) | ¥39,000     |
| 細胞障害性検出キット PLUS (LDH) | 4 744 926 | 1キット (400テスト)  | ¥17,000     |
|                       | 4 744 934 | 1キット (2000テスト) | ¥45,000     |

# アポトーシスの初期ステージの正確な検出

## 細胞死シグナルを同定するため機能アッセイをご利用ください

### カパーゼ3活性アッセイ

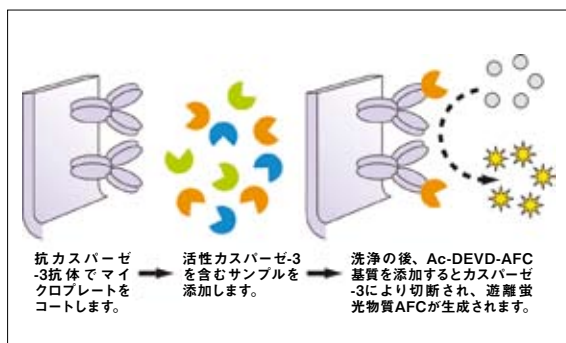
カパーゼ-3は、エクスクーショナーカパーゼのグループに属します。カパーゼ-3活性アッセイは、マイクロプレート中のカパーゼ-3活性を高感度に測定する蛍光免疫酵素アッセイ(FIENA)です(図17、18)。

#### ■特異的に検出

キットのカパーゼ-3特異的な抗 CPP32モノクローナルキャプチャー抗体を使い、ヒトカパーゼ-3およびそのリコンビナントの活性を(他種のカパーゼを検出することなく)特異的に検出できます(図17)。

#### ■僅かなアポトーシス細胞からもカパーゼ-3を検出

細胞集団中の5%と少数のアポトーシス細胞においてもカパーゼ-3を検出できます。



▲図17: カパーゼ-3活性アッセイの原理。

Ac-DEVD AFC = アセチル-Asp-Glu-Val-Asp-7-アミド-4-トリフルオロメチル-クマリン  
AFC=7-アミド-4-トリフルオロメチル-クマリン

### 標識アネキシン V

アポトーシスの初期段階で起こる変化の一つに、ホスファチジルセリン(PS)の原形質膜内側から外層への転座などがあります。アネキシン V は PS に高い親和性を持つ  $Ca^{2+}$  依存性のリン脂質結合タンパク質です。細胞膜の外層に露出した PS の高感度なプローブとしてよく用いられ、アポトーシス細胞の検出に適しています。

#### ■標識アネキシン V なら簡単

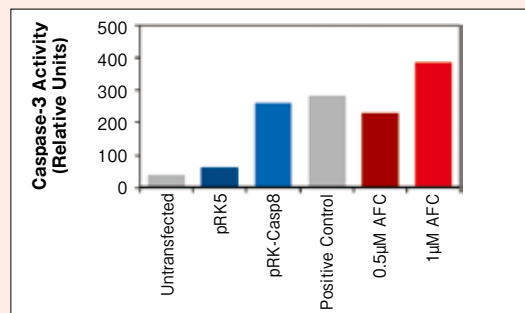
フローサイトメトリーや蛍光顕微鏡で簡単にアポトーシスを検出できます(図19)。

#### ■アポトーシス細胞とネクローシス細胞を正確に識別

迅速で簡単でありながら、長期間観察が可能で、アポトーシス細胞とネクローシス細胞を正確に判別できます。

#### 代表的なワークフロー実験 パート5:

カパーゼ-3活性アッセイキットを使用した、カパーゼ-8発現プラスミドをトランスフェクトした HeLa 細胞におけるカパーゼ-3活性の定量



▲図18: トランスフェクションの24時間後に測定されたカパーゼ-3活性。

カパーゼ-8発現ベクター pRK-Casp8 をトランスフェクトした HeLa 細胞 (ATCC® CCL-2™) では、高いカパーゼ-3活性を示したのに対し、トランスフェクトしなかった細胞や単なるベクターをトランスフェクトした細胞においてはカパーゼ-3活性が検出されませんでした。

実験の詳細は、“細胞解析アプリケーションノート No. 1”に掲載されています。

データは、ドイツのキール大学、S.Adam 氏のご厚意により提供されました。

| 製品名               | 製品番号      | 包装単位           | 希望販売価格 (税抜) |
|-------------------|-----------|----------------|-------------|
| アネキシン V-Alexa 568 | 3 703 126 | 500µl (250テスト) | ¥84,600     |
| アネキシン V-FLUOS     | 1 828 681 | 500µl (250テスト) | ¥84,600     |
| カパーゼ 3活性アッセイ      | 2 012 952 | 1キット (96テスト)   | ¥108,300    |

製品の詳細は、[www.roche-applied-science.com/apoptosis](http://www.roche-applied-science.com/apoptosis) をご参照ください。

# アポトーシスとネクローシスを簡単に判別

## DNA 断片化を検出する高感度 ELISA を用いて アポトーシスを定量化できます

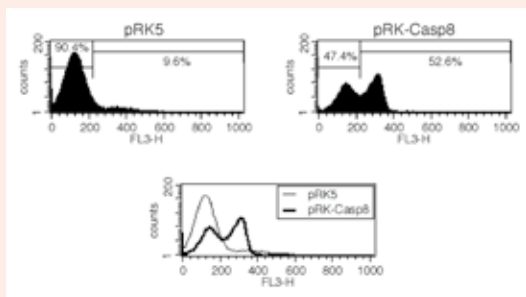
### 細胞死検出 ELISA<sup>PLUS</sup>

ゲノム DNA の各ヒストンごとの切断は、アポトーシスの進行度合の指標です。アポトーシスとネクローシス（このヌクレオソーム断片化を示さない）細胞の判別は、当社の1ステップ ELISA を用いて容易に行えます。アポトーシスを簡単に検出するために、各ヒストン単位の切断で生じるモノ及びオリゴヌクレオソームの測定をお勧めします。

定性的にバンドパターンを分析する時間のかかるゲル電気泳動法の代わりに、このヌクレオソームを定量する方法をお試しください。

#### 代表的なワークフロー実験 パート6:

アネキシン V-Alexa 568 を使用し、カスパーゼ-8 発現プラスミドをトランスフェクトした HeLa 細胞におけるアポトーシスの検出



▲ 図19: HeLa 細胞 (ATCC® CCL-2™) に FuGENE® HD トランスフェクション試薬を用いてカスパーゼ-8 発現ベクターをトランスフェクトしました。

48時間のインキュベート後、細胞をアネキシン V-Alexa 568 で染色し、FACS で分析しました。カスパーゼ-8 発現ベクターをトランスフェクトした細胞の50%以上が、陽性に染色されましたが、トランスフェクトしなかった細胞やカスパーゼ-8 インサートを含まないベクターをトランスフェクトした細胞では染色が見られませんでした。これは HeLa 細胞でのカスパーゼ-8 の過剰発現が、アポトーシスを誘導するのに充分であることを示唆しています。実験の詳細は、“細胞解析アプリケーションノート No. 1” に掲載されています。

データは、ドイツのキール大学、S.Adam 氏のご厚意により提供されました。

### ■アポトーシスとネクローシスの判別

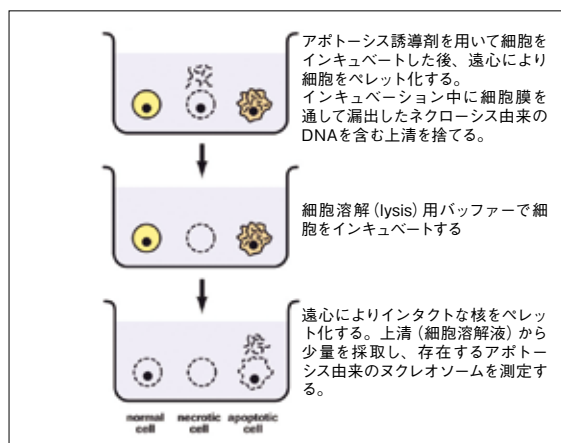
単一のアッセイでも同一のサンプル中においても、アポトーシスとネクローシスの判別が可能です(図20)。

### ■ハイスループットに対応可能

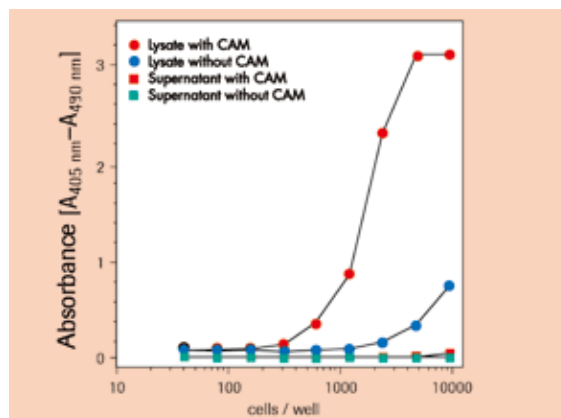
数百のサンプルを同時に扱え、時間と労力を節約できる1ステップ ELISA 法ですので、ハイスループットなアポトーシス分析が行えます。

### ■高感度

わずか600個の細胞中のアポトーシスを検出できます(図21)。



▲ 図20: 細胞死検出 ELISA<sup>PLUS</sup> でのサンプル調製ステップ。



▲ 図21: 細胞死検出 ELISA<sup>PLUS</sup> は、アポトーシス誘導抗生物質であるカンプトテシン (CAM) で処理された U-937 細胞中の細胞質のモノ及びオリゴヌクレオソームの増加を検出しました。

様々な数の U-937 細胞を 2µg/ml CAM 存在下及び不存在下で、37°C で4時間インキュベートしました。上澄みサンプルと細胞ライセートを標準プロトコールに従って分析しました。

| 製品名                            | 製品番号      | 包装単位     | 希望販売価格 (税抜) |
|--------------------------------|-----------|----------|-------------|
| 細胞死検出 ELISAキット <sup>PLUS</sup> | 1 774 425 | 96テスト    | ¥60,500     |
|                                | 1 920 685 | 10×96テスト | ¥411,500    |

# リアルタイム細胞解析とリアルタイム PCR の コンビネーション

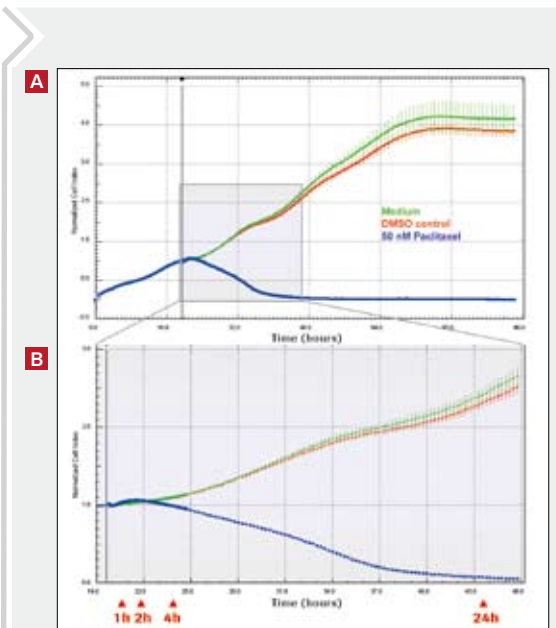
## 遺伝子発現プロファイリングを組み合わせた より充実した細胞解析

### xCELLigenceシステムのRTCAテクノロジー と RealTime ready 遺伝子発現プロファイ リングのコンビネーション

xCELLigence システムを使用した細胞イベントのオンラインモニタリングと LightCycler® 480 インストルメントを用いた qPCR 解析を組み合わせることで大きな利点を得ることができます。

本例では、HT29 細胞を paclitaxel (試験グループ) と DMSO (コントロールグループ) で処理しました。処理を行った細胞の挙動は xCELLigence RTCA SP システムでモニターしました (図22)。得られたセルインデックス (CI) 値を使用して、サンプルを採取する時間を決定しました。

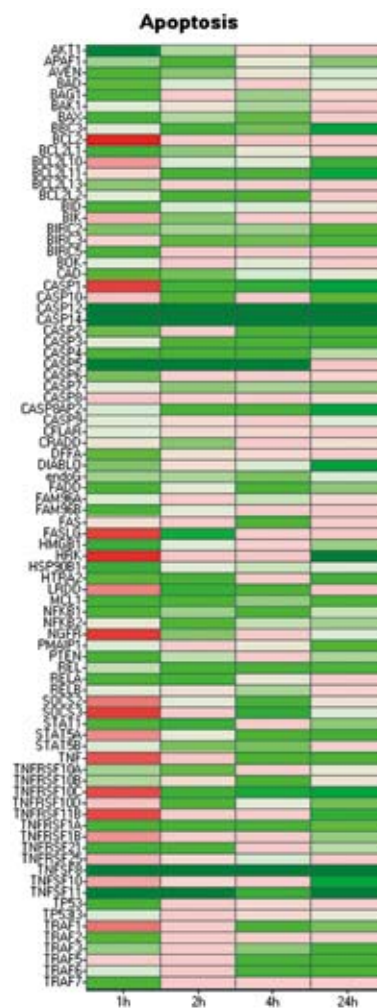
次に、High Pure RNA Isolation Kit を用いて高品質の RNA を精製し、Transcriptor First Strand Synthesis Kit を用いて cDNA を合成しました。84 個のアポトーシス関連遺伝子の発現レベルを、RealTime ready Human Apoptosis Panel (96 ウェル) で測定しました (図23)。



▲ 図22: paclitaxel (青色線)、DMSO (赤色線)、培地 (緑色線) 処理での HT29 細胞のセルインデックスプロファイル。

A) xCELLigence システムで得られた増殖プロファイルに由来するセルインデックス (CI) から、初期の細胞接着、対数増殖期、paclitaxel 処理への応答を読み取ることができます。細胞は 50 nM の paclitaxel (青色)、DMSO (赤色)、培地のみ (緑色) で表示の時間 (黒色実線) で処理されました。

B) paclitaxel 添加 (黒色実線) と RNA 分離 (赤色三角) の時間が表示されています。



◀ 図23: アポトーシスに関連する遺伝子発現のレベル。遺伝子発現の変化は、LightCycler® 480 システムと RealTime ready Human Apoptosis Panel (96 ウェル) を用いて、HT29 細胞の paclitaxel 処理後の 4 点の異なる時間で測定しました。緑色は未処理のコントロールと比較して遺伝子発現のアップレギュレート、赤色はダウンレギュレートされたことを示しています。色の強度は遺伝子発現における変化率を示しています。

# 表現型から遺伝子型へ 遺伝子発現解析のスタートを リアルタイム細胞モニタリングで行うには

## Ready-to-use のアッセイで遺伝子発現 レベルを迅速に定量

RealTime *ready* Focus Panels は、LightCycler® 480 システムを用いたリアルタイム PCR による網羅的な遺伝子発現解析に有用です。お客様にご用意いただくのは、サンプルの cDNA とマスターミックスだけです。各パネルに採用されている遺伝子群は、アポトーシスや ABC トランスポーター、細胞周期、GPCR、核レセプターを含む細胞パスイヤ遺伝子ファミリーなどがあり、遺伝子の迅速で簡便な解析を可能にします。

### ■ユニバーサルプローブライブラリーを採用

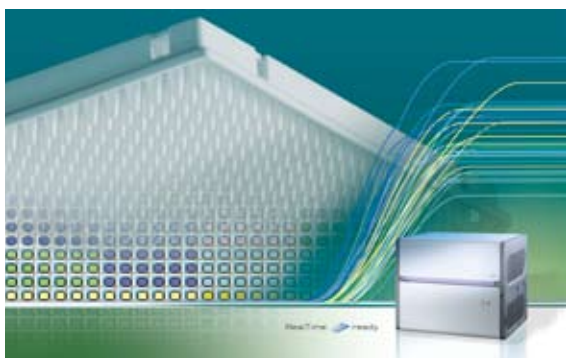
PCR プライマーとプローブデザインに、好評を頂いているユニバーサルプローブライブラリーを採用しています。

### ■高い簡便性

LightCycler® 480 マルチウェルプレートの 96 及び 384 ウェル上にプライマーとプローブが予め分注されているため、必要な作業工程はごくわずかです。

### ■機能試験済みの qPCR アッセイ

各プレートに各種コントロールとリファレンス遺伝子を含め、すべてのアッセイは機能試験済みです。



## ウェットバリデーション済みのアッセイ

それぞれの RealTime *ready* Focus Panels は、機能試験済みで以下の厳しい性能基準に基づき選定されています。

- PCR 効率は約 2.0
- スタンダードカーブの  $R^2$  値は 0.99-1.00
- ダイナミックレンジの直線性は 3 ログ以上

## Human Apoptosis Panel と Human Cell Cycle Regulation Panel

RealTime *ready* Human Apoptosis Panel (96 ウェル) と RealTime *ready* Human Cell Cycle Regulation (96 ウェル) は、それぞれ 84 種類のパスウェイ遺伝子、7 個のリファレンス遺伝子アッセイ、RNA のクオリティコントロールが 3 アッセイ、ゲノム DNA の夾雑のために 2 アッセイと、生理学的に信頼性のある qPCR データを取得できます。

## LightCycler® 480 インストルメント

LightCycler® 480 インストルメントは、核酸の検出や特性を明らかにすることが出来る、高い正確性と柔軟性を併せ持った 96 及び 384 ウェルプレートフォーマットのリアルタイム PCR プラットフォームです。そのスピードと正確性は、遺伝子の相対定量、及び絶対定量のすべてのニーズに、高いレベルでお応えします。

### ■ハイスピードで正確なサーモブロックサイクリングと、 データ検出のテクノロジー

比類のない温度均一性と、データの高い再現性を実現します。

### ■遺伝子発現アッセイの感度が大幅に向上

Transcriptor First Strand Synthesis Kit と、LightCycler® 480 Probes Master を使用することで、遺伝子発現アッセイの感度が大幅に向上します。

高速で、正確性の高いリアルタイム PCR の詳細は、以下のサイトでご参照ください。[www.lightcycler480.com](http://www.lightcycler480.com)

# より簡単に遺伝子発現レベルを確認するために Universal ProbeLibrary をお試しください

リアルタイム PCR における抜群の特異性と感度が得られる  
オンラインでのアッセイデザイン

## リアルタイム PCR による簡単に正確な 遺伝子発現定量

Universal ProbeLibrary (UPL) は SYBR Green I アッセイの簡便性と加水分解プローブアッセイの特異性の両方を合わせ持つアッセイシステムです。ウェブ上で無料公開されているデザインソフトウェアと165本の UPL プローブで、様々な生物種の qPCR アッセイを可能にします。標準的なプロトコルで、ほとんどすべてのリアルタイム PCR インストルメントに対応できます。

- 幅広い生物種におけるどんな遺伝子も定量可能
- 設計も手早く簡単  
無料のオンラインアッセイデザインソフトウェアにより qPCR アッセイを数分でデザイン(図24)。
- いつでもすぐに実験を  
全プローブでも僅か165本のため、すべてを冷凍庫で簡単に保管しておけます。
- コストを削減  
Universal ProbeLibrary リファレンス遺伝子セットと共に、マルチプレックス qPCR を行うことでさらにコストを削減できます。

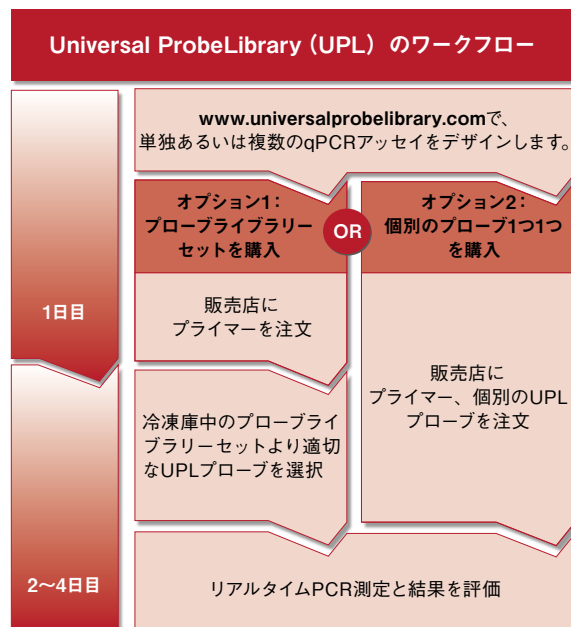
## ProbeFinder アッセイデザインソフトウェア

Universal ProbeLibrary を用いた qPCR アッセイの無料オンラインソフトウェアで、簡単なアッセイデザインをお試しください:

[www.universalprobelibrary.com](http://www.universalprobelibrary.com)

**ステップ1:** 生物種を選択し、配列情報、遺伝子名、アクセッションナンバーのいずれかを入力。

**ステップ2:** PCR プライマーと UPL プローブを使用した至適な qPCR アッセイが自動でデザインされます。



▲図24: 今日、qPCR アッセイをデザインして、明日、qPCR を実行することも可能です。

ProbeFinder ソフトウェアはターゲット配列中のすべてのイントロンの局在を調べ、UPL プローブがハイブリダイズする位置を探し、次にその部位の周辺の PCR プライマーを設計します。選択されたプライマーとプローブの組み合わせは特異性、イントロンスパニング、アンプリコンの長さ、Tm 値、その他のパラメーターに基づいてランク付けを行っています。

詳細は[www.universalprobelibrary.com](http://www.universalprobelibrary.com)

または[www.gene-expression.roche.com](http://www.gene-expression.roche.com)をご参照ください。



# 正確なタンパク質の検出と定量化をより確実なものに 簡単にタンパク質を保護

## cOmplete プロテアーゼインヒビター カクテル錠

セリン、システイン、メタロプロテアーゼなど、幅広い種類のプロテアーゼを阻害するには、cOmplete をお試しください。便利ですぐ使える水溶性のタブレットは、動物、植物、酵母および菌等のあらゆる細胞タイプのタンパク質分解活性を阻害するプロテアーゼインヒビターのブレンドです(図25)。

### ■より使いやすく

新しい EASY Pack (PTP 包装) で cOmplete はより作業が簡単になりました。

### ■ライセートと合わせたキットも

cOmplete ライシスキットをご使用いただければ、同じ包装形態で、簡単な細胞溶解と簡易で確実なプロテアーゼ阻害も可能です。



## PhosSTOP ホスファターゼインヒビター カクテル錠

PhosSTOP 錠で、タンパク質の脱リン酸化を簡易かつ確実に阻害します。

必要な作業は10ml バッファーに1錠を溶解するだけです。

### ■阻害可能なホスファターゼは広範囲

酸性、アルカリ性、セリン/トレオニン(例: PP1, PP2A, PP2B)、チロシンなど、ほとんどのホスファターゼを阻害します。

### ■様々な試料に使用可能

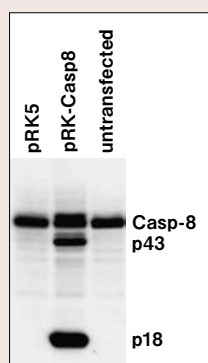
ほ乳類、昆虫または植物細胞およびパラフィン埋包 (FFPE) 組織切片など、多様な試料におけるホスファターゼを抑制します。

### ■ cOmplete との組み合わせにも対応

cOmplete と PhosSTOP 錠は組み合わせることで、簡単にプロテアーゼとホスファターゼを同時に阻害できます。

## 代表的なワークフロー実験 パート7:

cOmplete ライシス-M キットと Lumi-Light<sup>PLUS</sup> ウエスタンブロットング試薬を使用した HeLa 細胞におけるカスパーゼ-8過剰発現の検出\*



◀ 図25: カスパーゼ-8発現ベクター (pRK-Casp8) でトランスフェクションした HeLa 細胞 (ATCC<sup>®</sup> CCL-2<sup>™</sup>) を、トランスフェクションから24時間後に溶解し、 $\alpha$ -カスパーゼ-8抗体を使用してウエスタンブロットングで分析しました。

トランスフェクトしていない細胞とカスパーゼ-8発現ベクターをトランスフェクトした細胞内で、分子量55kDの内在性カスパーゼ-8のスプライシングバリエーションが、Lumi-Light<sup>PLUS</sup> ウエスタンブロットングキットで検出されました。pRK-Casp8をトランスフェクトした細胞では、FLAG タグ・カスパーゼ-8に相当する僅かに大きなタンパク質も検出されました。典型的な43kDと18kDの2つのバンドも検出されました。

実験の詳細は、“細胞解析アプリケーションノート No. 1”にも記述されています。

データは、ドイツのキール大学、S.Adam 氏のご厚意により提供されました。

| 製品名                        | 製品番号      | 包装単位 | 希望販売価格<br>(税抜) |
|----------------------------|-----------|------|----------------|
| cOmplete ミニ<br>(ガラスバイアル入り) | 1 836 153 | 25錠  | ¥18,500        |
| cOmplete ミニ<br>(EASYパック入り) | 4 693 124 | 30錠  | ¥22,200        |
| cOmplete<br>ライシス-M         | 4 719 956 | 1キット | ¥41,800        |
| PhosSTOP                   | 4 906 845 | 10錠  | ¥8,500         |
|                            | 4 906 837 | 20錠  | ¥16,500        |

詳細情報は、

[www.rocke-applied-science.com/proteaseinhibitor](http://www.rocke-applied-science.com/proteaseinhibitor)  
をご参照ください。

# タンパク質発現の定量に高感度なアッセイを 信頼できる定量化のためのウェスタンブロットリングを お試しください

## Lumi-Light<sup>PLUS</sup> ウェスタンブロットリング製品

Lumi-Light ウェスタンブロットリング製品は、プロットしたタンパク質の化学発光検出のための簡便で、信頼性における、高感度な試薬です(図26)。

標準的なアプリケーションには、Lumi-Light ウェスタンブロットリング基質をお試しください。さらに感度が必要な場合は Lumi-Light<sup>PLUS</sup> ウェスタンブロットリング基質をお試しください。最大限の簡便さと感度のためには Lumi-Light<sup>PLUS</sup> ウェスタンブロットリングキットをお試しください。キットにはマウスやウサギの一次抗体を使用するウェスタンブロットリングのための試薬がセットになっています。

### ■お客様の必要なレベルに応じて、試薬を選択可能 (表1)

### ■一次抗体の必要使用量を少なく

少量であっても強いシグナルを取得可能な為、発色検出システムに比べて、抗体を10-100倍希釈しても同等の感度となり、貴重な一次抗体量を節約できます。

| 製品       | Lumi-Light ウェスタンブロットリング基質    | Lumi-Light <sup>PLUS</sup> ウェスタンブロットリング基質 |
|----------|------------------------------|---|
| 感度       | 10-50 pgの抗原                  | 1-5 pgの抗原                                 |
| 一次抗体の希釈  | 発色検出システムの10倍希釈               | 発色検出システムの100倍希釈                           |
| シグナルの安定性 | >3時間(30分間のインキュベーションでシグナルが増強) | >9時間(30分間のインキュベーションでシグナルが増強)              |

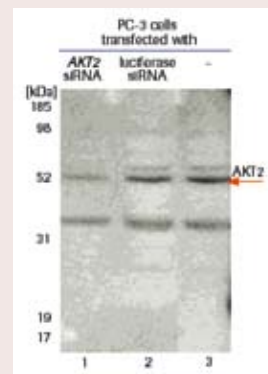
表1: Lumi-Light ウェスタンブロットリング基質の比較。

| 製品名  | 製品番号      | 包装単位                               | 希望販売価格 (税抜) |
|--|-----------|------------------------------------|-------------|
| Lumi-Light <sup>PLUS</sup> ウェスタンブロットリングキット (マウス/ウサギ) | 2 015 218 | 1キット (1,000cm <sup>2</sup> メンブレン)  | ¥88,000     |
| Lumi-Light ウェスタンブロットリング基質                            | 2 015 200 | 400ml (4,000cm <sup>2</sup> メンブレン) | ¥27,400     |
| Lumi-Light <sup>PLUS</sup> ウェスタンブロットリング基質            | 2 015 196 | 100ml (1,000cm <sup>2</sup> メンブレン) | ¥50,600     |

## 代表的なワークフロー実験 パート8:

PC-3細胞におけるタンパク質レベルでの AKT2ノックダウンの確認

トランスフェクションの2日後に、細胞を cOmplete プロテアーゼインヒビターの存在下で溶解しました。PVDF メンブレンを使用する標準的なプロトコールに従って、溶解液を使用しブロットリングをしました。ヤギ Anti-AKT2抗体でのインキュベーションの後、HPR 標識 anti-Goat IgG、LumiLight<sup>PLUS</sup> ウェスタンブロットリングキット(マウス/ラビット)に含まれるブロッティング試薬と基質を組み合わせて検出しました。AKT2タンパク質の発現は、AKT2特異的 siRNA のトランスフェクション(図26、レーン1) 後、85%減少し、ルシフェラーゼ特異的 siRNA のトランスフェクション(図26、レーン2)では効果はありませんでした。



▲図25: カスパーゼ-8発現ベクター(pRK-Casp8)でトランスフェクトした HeLa 細胞(ATCC® CCL-2™)を、トランスフェクションから24時間後に溶解し、 $\alpha$ -カスパーゼ-8-抗体を使用してウェスタンブロットリングで分析しました。

さまざまな siRNA をトランスフェクトされた細胞から精製された等量のタンパク質を SDS-PAGE にアプライし、AKT2特異的抗体によりウェスタンブロットリング分析を行いました。40kD のバンドは、一次抗体の非特異的な反応でのコントロールとして使用されました。

レーン1: AKT2 siRNA でトランスフェクトした PC-3細胞  
レーン2: ルシフェラーゼ siRNA でトランスフェクトした PC-3細胞  
レーン3: トランスフェクトしていない PC-3細胞

詳細は、“ジーンノックダウンプロローシャー”にも掲載されています。  
[www.roche-applied-science.com/geneknockdown](http://www.roche-applied-science.com/geneknockdown)

# トータルタンパク質発現の正確な定量

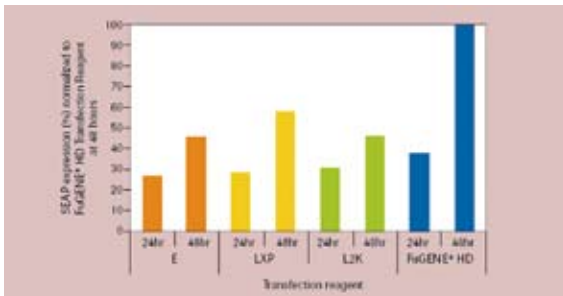
## 迅速で高感度の Non-RI レポータージーンアッセイをお試しください

### SEAP レポータージーンアッセイ

本キットは、トランスフェクション細胞の培養上澄の中に分泌される、ヒト胎盤性アルカリフォスファターゼ(AP) 活性の定量的測定のための化学発光アッセイです。細胞溶解の必要が無いため、本実験後、他の解析に用いることも可能です。

- 測定時間は約1時間
- わずか10fg の AP でも検出可能

トランスフェクション後の2点(24時間後と48時間後)で、細胞からの上澄を希釈(1:400)し、SEAP 活性を SEAP レポータージーンアッセイキットを用いて測定しました。トランスフェクトの24時間後と48時間後における、SEAP の発現は、試験された細胞がうまくトランスフェクトされたことを示唆しています(図27)。各アッセイ時点で、FuGENE® HD トランスフェクション試薬が最高の SEAP の発現を示したことは特筆すべき結果です。

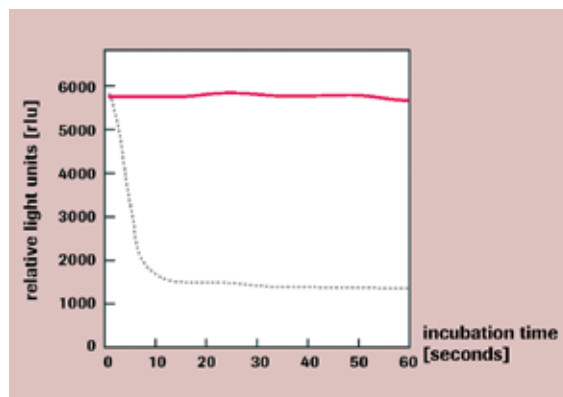


▲図27：トランスフェクション効率の定量。  
オーバーナイトインキュベーションの後、MCF7(ATCC® HTB-22)細胞をウェル当たり200,000個と400,000個の密度で6ウェルプレートに播種し、FuGENE® HD トランスフェクション試薬の至適量でトランスフェクトしました。トランスフェクション後の2つの各時間(24時間後と48時間後)で、細胞からの上澄を希釈(1:400)し、SEAP 活性を SEAP レポータージーンアッセイキットを用いて測定しました。トランスフェクションの24時間後と48時間後における、SEAP の発現は、試験された細胞がトランスフェクションに成功したことを示しています。4つの試薬の中で、FuGENE® HD トランスフェクション試薬が最高の SEAP の発現を示しました。

### ルシフェラーゼレポータージーンアッセイ

ホタル(*Photinus pyralis*)ルシフェラーゼをコードするベクターでトランスフェクトした真核細胞および、細菌におけるホタルルシフェラーゼの発現を定量的に測定する際は、ルシフェラーゼレポータージーンアッセイをお試しください(図28)。

ルシフェラーゼレポータージーンアッセイは、プレートやシングルチューブを用いたマニュアルまたは自動化ルミノメーターで測定できる他、シンチレーションカウンターや写真フィルムでも測定可能です。最も高い感度を得るためには、超高速フォトンカウンターを搭載したルミノメーターの使用を推奨します。

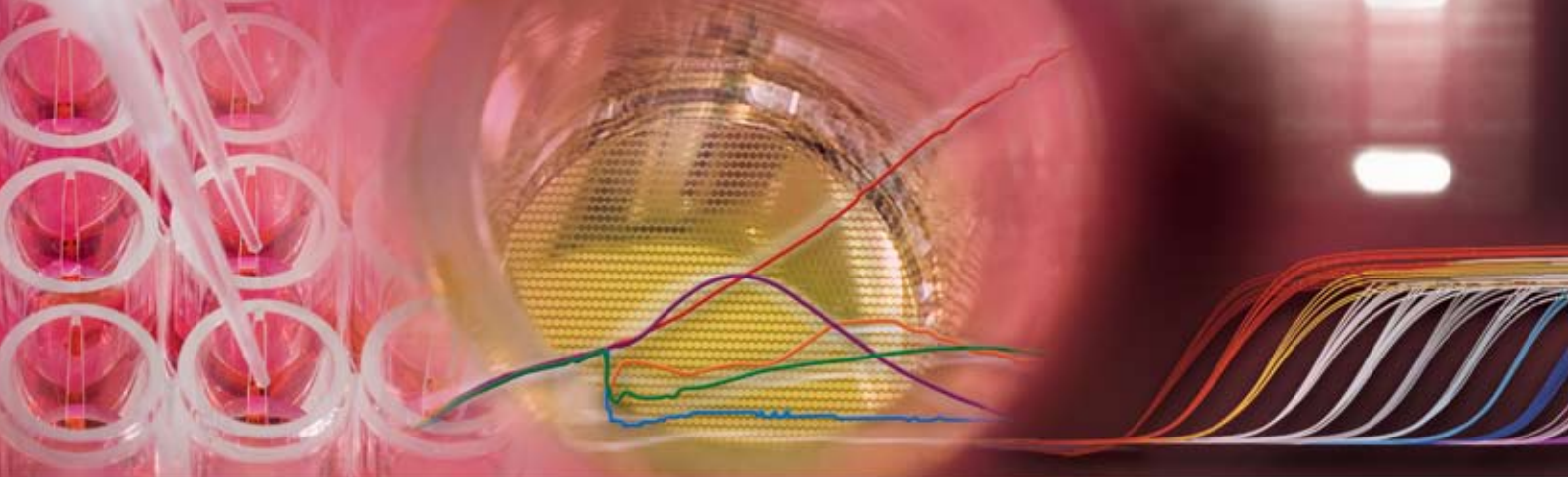


▲図28：ルシフェラーゼの最大発光カインेटクスにおける Coenzyme A(CoA) の影響。

ロシュ・ダイアグノスティックスのルシフェラーゼレポータージーンアッセイキット(CoA を含む：上段の曲線)と、CoA を含まない標準的なルシフェラーゼアッセイ(下段の曲線)との比較。CoA を添加しない場合、総発光量全体の50%以上が最初の10秒間に消費されました。これに対して、CoA を添加した場合は直線的な発光が20-30秒間以上維持され、約5分が半減期となり、感度が増強されました。

| 製品名                                | 製品番号      | 包装単位   | 希望販売価格(税抜) |
|------------------------------------|-----------|--|------------|
| SEAP<br>レポーター<br>ジーンアッセイ<br>化学発光   | 1 779 842 | 1キット<br>(500アッセイ、マイク<br>ロプレートフォー<br>マット、または250<br>アッセイ、チューブ<br>フォーマット) | ¥48,200    |
| ルシフェラーゼ<br>レポーター<br>ジーンアッセイ<br>高感度 | 1 669 893 | 1キット<br>(200アッセイ)  | ¥20,600    |

タンパク質  
発現の検証



[www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com)

**License Disclaimer**

Parts of the Software used for the LightCycler 480 System are licensed from Idaho Technology Inc., Salt Lake City, UT, USA.

This product is covered by one or more of U.S. 6,197,520, 6,303,305, 6,387,621, 6,503,720, 6,730,501 and corresponding claims in their non-U.S. counterparts, owned by Roche Diagnostics GmbH and/or licensed from Idaho Technology, Inc.

This product is covered in-part by US 5,871,908 or any foreign equivalents, co-exclusively licensed from Evotec OAI AG.

The purchase price includes a license to practice the methods covered by US 5,871,908 by using the product. Purchase of this product, however, does not convey to the purchaser a license or right to

(i) commercially make, have made or sell reagents and/or kits, or  
(ii) buy or use reagents and/or kits provided by a third party used in conjunction with the product or any other thermocycler to practice the methods covered by US 5,871,908 or any foreign equivalents.

This LightCycler® 480 Real-Time PCR System is a real-time thermal cycler licensed for use in research under U.S. Patent No. 6,814,934 and corresponding claims in its non-U.S. counterparts, and under one or more of U.S. Patents Nos. 5,038,852, 5,656,493, 5,333,675, 5,475,610, 5,602,756, 6,703,236, 7,238,517, or corresponding claims in their non-U.S. counterparts, owned by Applied Biosystems. No right is conveyed expressly, by implication, or by estoppel under any other patent claim, such as claims to apparatus, reagents, kits, or methods such as 5' nuclease methods. This instrument is for research use only. For further information on purchasing licenses for research and other non-in vitro diagnostic applications, contact the Director of Licensing at Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

A license to perform the patented 5' Nuclease Process for research is obtained by the purchase of (i) both Authorized 5' Nuclease Core Kit and Licensed Probe, (ii) a Licensed 5' Nuclease Kit, or (iii) license rights from Applied Biosystems.

This product is an Authorized 5' Nuclease Core Kit. Use of this product is covered by one or more of the following US patents and corresponding patent claims outside the US: 5,079,352, 5,789,224, 5,618,711, 6,127,155, 5,677,152, 5,773,258, 5,407,800, 5,322,770, 5,310,652, 5,210,015, 5,487,972, and claims outside the US corresponding to US Patent No. 4,889,818. The purchase of this

product includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product for the purchaser's own internal research.

Separate purchase of a Licensed Probe would convey rights under the applicable claims of US Patents Nos. 5,538,848, 5,723,591, 5,876,930, 6,030,787, 6,258,569, 5,804,375 (claims 1-12 only), and 6,214,979, and corresponding claims outside the United States.

No right under any other patent claim and no right to perform commercial services of any kind, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for research use only. Diagnostic uses under Roche patents require a separate license from Roche.

Further information on purchasing licenses may be obtained from the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

Purchaser represents and warrants that it will use FuGENE® HD Transfection Reagent purely for research purposes. Transfected cells, materials produced, and any data derived from the use of FuGENE® HD Transfection Reagent, may be used only for the internal research of Purchaser whether Purchaser is a „for-profit “ or a „not-for-profit “ organization. Under no circumstances may FuGENE® HD Transfection Reagent be used by Purchaser or any third party for a commercial purpose unless Purchaser has negotiated a license for commercial use with Fugent, LLC (contact information: License@FugentLLC.com). For purposes of the foregoing sentence, „commercial purpose “ shall mean use of FuGENE® HD Transfection Reagent for profit or commercial gain.

By using FuGENE® HD Transfection Reagent, Purchaser agrees to be bound by the above terms. If Purchaser wishes not to be bound by these terms, Purchaser agrees to return the FuGENE® HD Transfection Reagent to Roche Diagnostics for a full refund.

For life science research only.

COMPLETE, GENOPURE, HIGH PURE, LIBERASE, LIGHTCYCLER, LC, PHOSSTOP, REALTIME READY, XCELLIGENCE and X-TREMEGENE are trademarks of Roche.

E-PLATE and ACEA BIOSCIENCES are registered trademarks of ACEA Biosciences, Inc. in the US. ProbeLibrary and ProbeFinder are registered trademarks of Exiqon A/S, Vedbaek, Denmark.

FuGENE is a registered trademark of Fugent, L.L.C., USA.

Other brands or product names are trademarks of their respective holders.



お問い合わせは…

**ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社**

**AS事業部 (研究用試薬・機器)**

本社 : 〒105-0014 東京都港区芝2丁目6番1号

TEL.03-5443-5287 FAX.03-5443-7098

E - M a i l : [tokyo.biochemicals@roche.com](mailto:tokyo.biochemicals@roche.com)

U R L : <http://www.roche-biochem.jp>