

アプリケーションデータシート #005

化学発光検出解析装置 **LumiVisionPRO HS II** No. 02

化学発光および生物発光を利用した遺伝子発現の解析



ルミビジョンプロHS II による化学発光および生物発光の検出例

【ルミビジョンプロHS II】は、化学発光(ケルミネスセンス)の検出において自動で最適な露光時間の画像が得られる『オートモニタリング機能』が特徴の化学発光検出解析装置ルミビジョンプロの超高感度モデルです。

アプリケーションデータシート#003「ルミビジョンプロHS II No. 01」では、この【ルミビジョンプロHS II】の感度についてご紹介いたしました。今回は、京都大学大学院の望月博士のご協力による、シロイヌナズナの遺伝子発現を化学発光およびルシフェラーゼで解析した事例をご紹介いたします。

1. 化学発光の検出

■ サザンブロットハイブリダイゼーション(図1)

ホタルルシフェラーゼ遺伝子*luc+*(プロメガ)を導入したシロイヌナズナの形質転換体からゲノムDNAを抽出して制限酵素処理し、*luc+*に対するプローブでハイブリダイゼーションを行いました。検出はDIG Luminescent Detection試薬(ロツシュ・ダイアグノスティックス)を用いて行いました。

■ ノーザンブロットハイブリダイゼーション(図2)

シロイヌナズナの実生からトータルRNAを抽出し、rRNAおよび光誘導性遺伝子*Lhcb1*のmRNAに対するプローブでハイブリダイゼーションを行いました。検出はサザンブロットハイブリダイゼーションと同様の試薬を用いて行いました。

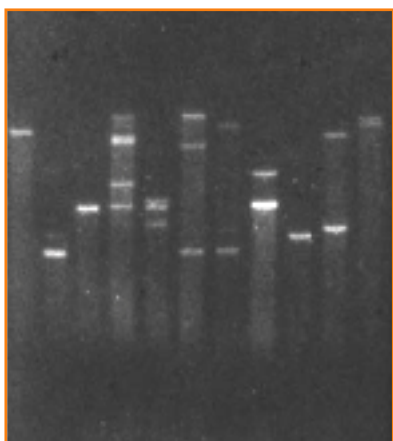
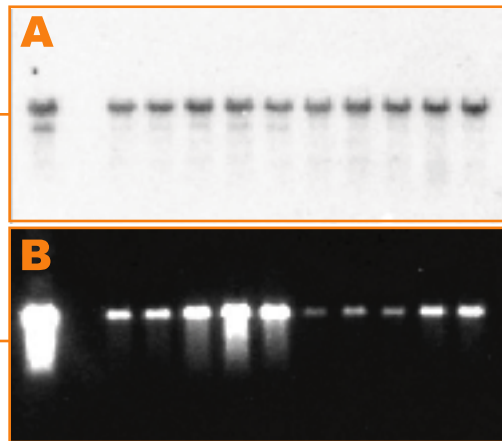


図1. シロイヌナズナの形質転換体における*luc+*プローブでのサザンブロット解析

図2. シロイヌナズナの様々な突然変異体における*Lhcb1*の発現比較
A: rRNA(写真はネガイメージ)
B: *Lhcb1*(写真はポジイメージ)



2. 生物発光の検出～ルシフェラーゼ～

■ ルシフェラーゼについて

ルシフェラーゼとはホタルやウミシイタケといった発光生物が持つ酵素で、酸素やアデノシン三リン酸(ATP)の存在下でルシフェリンという基質の酸化反応を図3のように触媒します。ルシフェリンは酸化されることで黄色い光(約560nm)を發します。このような性質から、ルシフェラーゼは遺伝子の発現解析(レポーターアッセイ)などに利用されています。

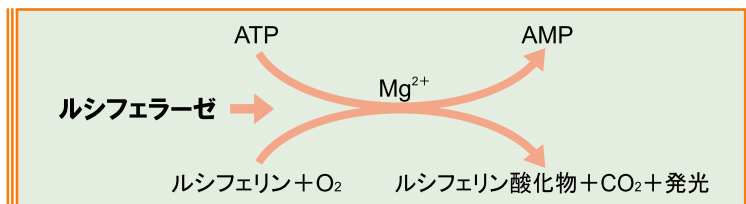


図3. ルシフェラーゼによる発光反応のしくみ
ATP: アデノシン三リン酸
Mg²⁺: マグネシウムイオン
AMP: アデノシン一リン酸
O₂: 酸素
CO₂: 二酸化炭素

■ルシフェラーゼを用いた遺伝子発現レベルの解析

光誘導性遺伝子*Lchb1*のプロモーターにホタルルシフェラーゼ遺伝子*luc+*(プロメガ)を連結してシロイヌナズナに導入、形質転換体を得ました。植物体内での*Lchb1*の発現レベルをモニターすることが目的です。



図4. ルシフェラーゼの発光(5分露光)
*luc+*を導入したシロイヌナズナを2週間生育させ、検出時にルシフェリンを噴霧しました。

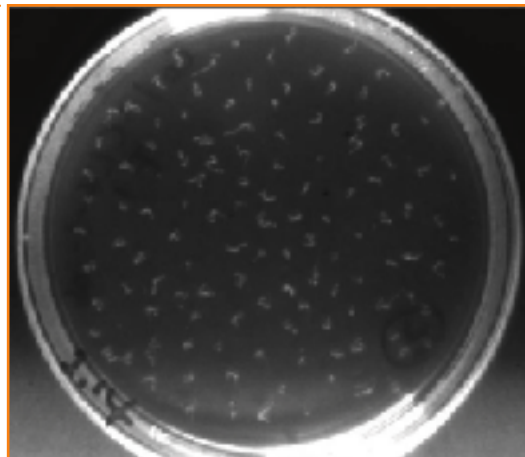


図5. 明視野での撮影像
図4のサンプルを白色光下で撮影したものです。図4と見比べると、発光している個体が分かります。

■立体物の撮影における注意点

ルシフェラーゼで特定の遺伝子発現を見る場合、撮影の対象となるのは生物個体、つまり立体物であることが多いと思います。【ルミビジョンプロHS II】でルシフェラーゼの発光を検出撮影する際は、CCDカメラ部の光学フィルターをすべてはずして『化学発光検出モード』で行いますが、立体物に対して全体的にピントを合わせるため、カメラレンズの絞りを4~8程度に絞ることをお勧めします(全開放では0.95です)。化学発光のような微弱な光を検出するためには絞りを全開放することが一般的ですが、こうすると立体物の場合はピントが合いにくくなるためです。【ルミビジョンプロHS II】では従来機種よりも絶対的な感度が向上しているため、このようにピント合わせを主眼においても感度を損ねる心配がありません。

おわりに

【ルミビジョンプロHS II】は、一部、使い勝手などの面において生物発光検出専用の装置ほどの優位性はありませんが、今回はお客様のご協力により、ルシフェラーゼの発光検出への応用も示唆できる事例をご紹介することができました。

ノート型パソコンで場所をとらずに操作できるこの超高感度な化学発光検出解析装置を、ぜひ皆様のご研究にお役立てください。

※LumiVision PRO HSIIを含むLumiVisionシリーズは現在販売を終了しています。

化学発光検出解析装置
LumiVision PRO HSII

※価格はお問い合わせください。







販売元: タイテック株式会社 製造元: アイシン精機株式会社

●本製品の価格および詳細については、製品カタログをご覧ください。

著者・編集

タイテック株式会社

商品企画部 宣伝企画グループ

〒343-0822 埼玉県越谷市西方2693-1

TEL:048-988-8359 FAX:048-988-8362

E-mail: miyatani@taitec.org

ホームページ: <http://www.taitec.ne.jp/>

実験データのご提供

京都大学大学院 理学研究科 植物学教室 望月伸悦 博士

2003年4月発行(2004年1月改訂)

本紙についてのお問い合わせは、左記までお願いいたします。