

Ready-To-Glow™ Secreted Luciferase Reporter Systems

Ready-To-Glow Secreted Luciferase System은 gene expression을 쉽고, 간단하게 직접적으로 관찰할 수 있는 시스템으로, 하나의 reporter gene을 detection하는 system (Ready-To-Glow™ Secreted Luciferase Reporter System)과 두가지 reporter gene을 동시에 detection 할 수 있는 system (Ready-To-Glow™ Dual Secreted Reporter System)이 구축되어 있다.

이 시스템에 사용되는 luciferase는 새로운 Secreted luciferase인 *Metridia* luciferase이다. 이 luciferase는 *Metridia Longa* 유래의 약 24 kDa의 protein으로 기존의 다른 luciferase에 비해 높은 감도를 가지고 있다(그림 1). 본 시스템은 gene expression을 모니터링할 때 cell lysis 과정이 필요없으며, transfection한 cell supernatant에서 reporter의 양을 바로 측정할 수 있기 때문에 매우 간단하면서 시간도 절약할 수 있다. 그림 2에는 기존의 non-secreted luciferase 시스템과 비교한 실험과정을 기재하였다.

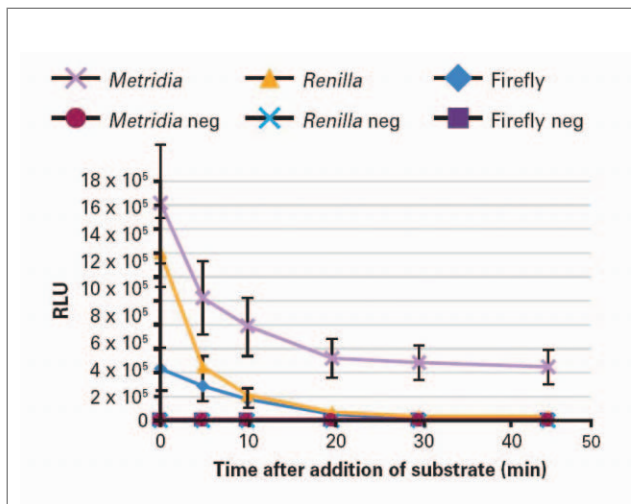


그림 1. High signal intensity and stability using secreted *Metridia* luciferase. CHO cells were plated into 96-well plates and transiently transfected with CMV-driven constructs encoding non-secreted firefly luciferase, non-secreted *Renilla* luciferase, and sequence-optimized secreted *Metridia* luciferase, 24hr after transfection, luciferase activity in equivalent sample amounts was analyzed by addition of the recommended substrate. The signal was measured at different timepoints over a period of 45 min. (neg = negative control.)

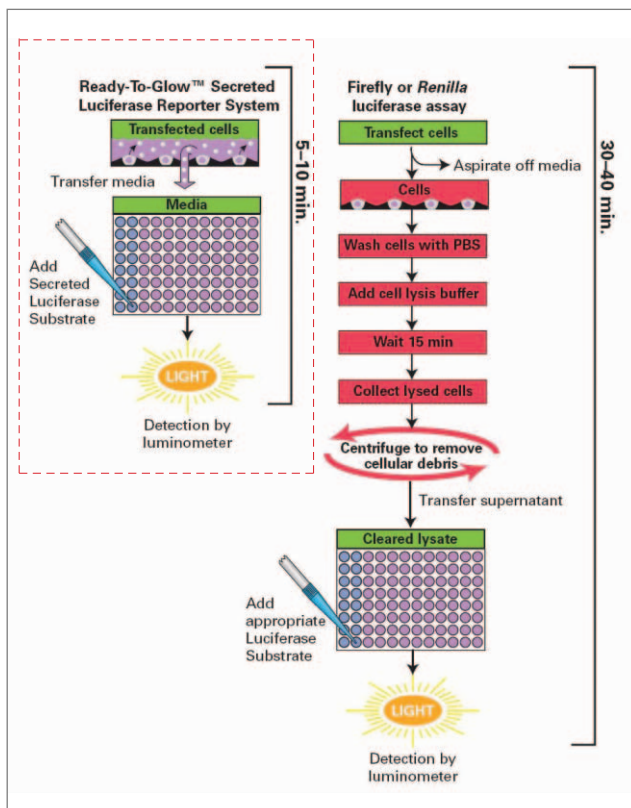
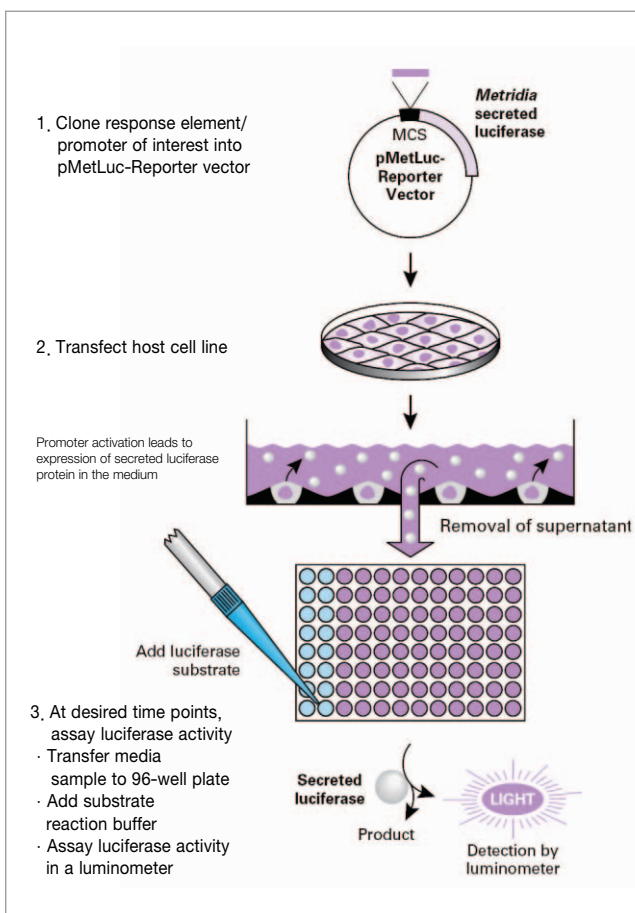


그림2. Ready-To-Glow™ Secreted Luciferase Reporter System workflow comparison with other non-secreted luciferase reporter systems.

Ready-To-Glow™ Dual Secreted Reporter System

살아있는 세포내에서 두 가지 종류의 promoter activity를 동시에 관찰가능

- 단일 배양 조건으로 2종의 assay data를 얻을 수 있다
- Cell lysis가 불필요하며, 세포를 그대로 유지할 수 있으므로 downstream application에 사용 가능하다.

서로 다른 promoter activity를 동시에 detection할 수 있는 기술은 세포신호전달경로를 밝혀내는 연구에서는 매우 유용한 방법이다. 이 방법을 발전시켜 reporter에 특이적으로 결합하는 기질을 첨가하여 구별이 가능한 두 가지 종류의 secreted reporter를 이용한 Ready-To-Glow Dual Secreted Reporter System을 개발하였다.

Chemiluminescence를 이용하여 검출하는 dual reporter assay

이 dual system에서의 첫번째 reporter는 *Metridia longa* 유래의 Ready-To-Glow Secreted Luciferase이다. 이 효소는 N-terminal secreted signal을 가지고 있는 24kDa의 단백질이다. 이 단백질의 cDNA 배열은 human codon에 최적화 및 예상되는 splicing 부위를 제거하여 단백질 발현 증가 및 mRNA 안정화에 최적화되어 있다. 두번째 reporter는 secreted human placental alkaline phosphatase(SEAP)이다. 세포를 이 두 개의 reporter로 co-transfection하여 *Metridia* luciferase 또는 SEAP 혹은 그 양쪽 모두를 발현하여 분비되도록 자극하고, 각각의 효소 특이적 기질을 첨가하면 그 결과를 얻을 수 있다. Chemiluminescence 측정을 통해 배양액 시료중의 promoter 특이적인 활성 검출이 가능하다.

Comparable Reporter Activity is suitable for time course assays

2 개의 reporter는 stable 또는 transiently transfection한 세포로부터 배양액으로 분비되기 때문에 세포를 lysis 하지 않고 반복적으로 sample을 얻을 수 있다. 이 2개 reporter의 secretion kinetics는 매우 유사하기 때문에(그림3), 세포 배양액 내의 각각의 reporter 분자량은 각각의 promoter 활성을 나타낸다.

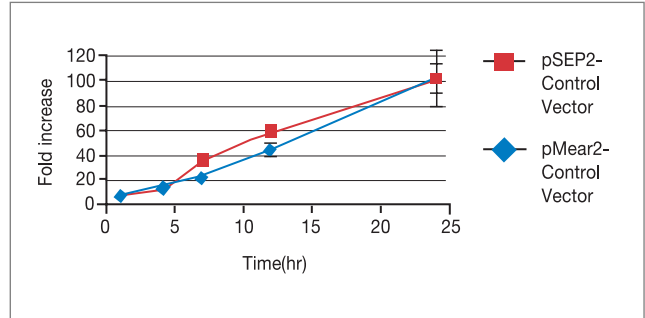
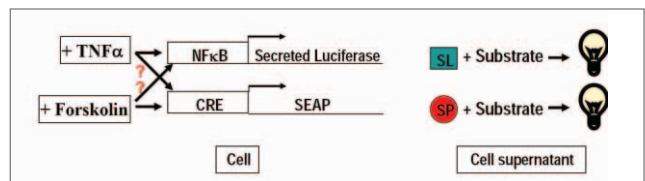


그림3. Similar secretion kinetics of *Metridia* secreted luciferase and SEAP enable accurate comparisons of the relative timing of promoter activity.

HeLa cells were plated into 6-well plates and transiently transfected with either the pMetLuc-Control vector or the pSEAP-Control vector. Media samples from the transfected cells were collected from 3 wells at each time point by removing enough media to run either the luciferase or the SEAP assay. Each sample was tested in triplicate, using a white bottom 96-well microtiter plate on a Turner BioSystems Veritas® Luminometer

Monitor two promoters simultaneously

Dual secreted reporter 시스템에서는 2 종의 promoter 활성 변화를 multiplex 형식으로 detection하는 것이 가능하다(그림 4). HEK 293 세포에 2 종의 reporter construct를 co-transfection하였다. 하나의 실험군에서는 *Metridia* secreted luciferase 발현을 유도하는 NFκB response element, 또 다른 하나의 실험군에서는 SEAP 발현을 유도하는 cAMP response element(CRE)를 포함한 construct를 만들어 실험에 이용하였다. TNF-α 또는 forskolin에 의해 각각의 promoter는 따로 활성화되었으며, 2 개의 promoter 또는 2 개의 reporter 시스템간에 cross-talk은 관찰되지 않았다.



Retain live cells for other applications

Secreted reporters를 이용하면 live cell assays가 가지고 있는 모든 장점을 활용할 수 있다. 목적 promoter가 특정의 inducer에 의해 활성화 되지 않는 경우, 그 배양액을 제거하고, 다른 inducer를 포함한 배양액으로 바꿀 수도 있으며, reporter assay 후에도 실험에 사용한 cell을 RNA 분석 또는 단백질 해석용으로 사용할 수 있다.

이 새로운 Ready-To-Glow Dual Secreted Reporter System 의 2 종의 promoter를 이용하면 live cell에서 지속적으로 모니터링하는 것이 가능하다. Cell lysis를 하지 않고 검출이 가능하므로, 2 종의 목적 promoter의 명확하고 직접적인 비교가 가능하다.

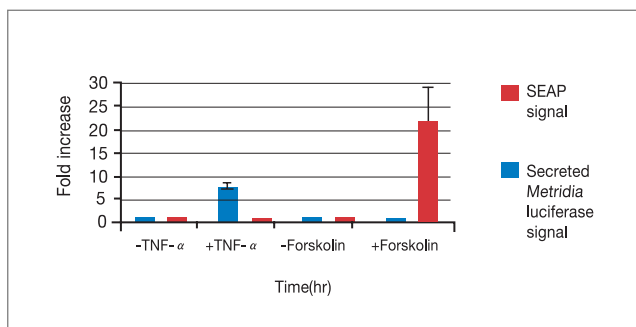



그림 4. Monitoring activation of two promoters simultaneously. HEK 293 cells co-transfected with pNFkB-TA-MetLuc and pCRE-SEAP constructs were treated with fresh media alone or with media containing either 1,000 ng/ml TNF- α or 10 μ M forskolin. Culture supernatant samples were collected 7 hr later and assayed as in Figure 1, using a BD Monolight™ 3096 Luminometer.

제품리스트

Product	TaKaRa Code	Size
Ready-To-Glow Secreted Luciferase pMetLuc Vector Kit	631729	each
Ready-To-Glow Secreted Luciferase Reporter Assay	631726	100 rxns
	631727	500 rxns
	631728	1,000 rxns
Ready-To-Glow Secreted Luciferase Reporter System	631730	100 rxns
	631731	500 rxns
	631732	1,000 rxns
Ready-To-Glow Dual Secreted Reporter Assay	631734	500 rxns
Ready-To-Glow Dual Secreted Reporter Vector Kit	631735	4 x 20 ug



TALON®

Bacterial Expression and Purification Kits

- ▶ Clone, express, and purify – all with a single Kit
- ▶ Based on the well-characterized pET system