



## Living Colors® Fluorescent Proteins Fruit Fluorescent Proteins



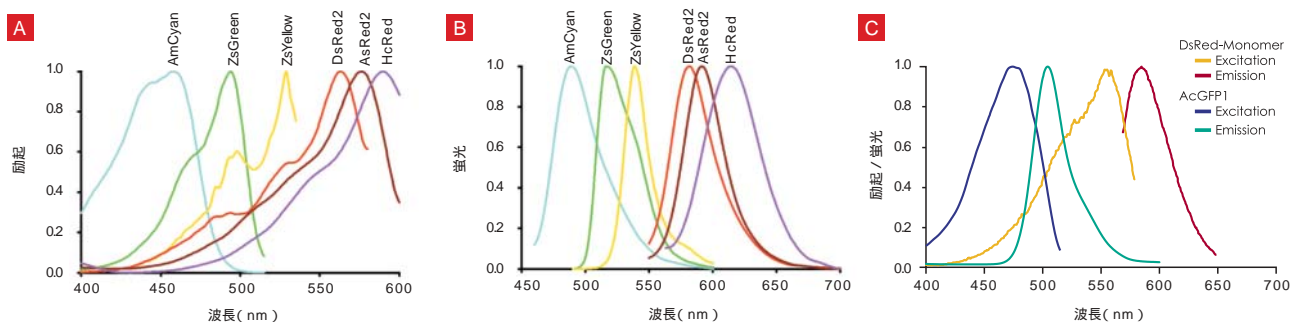
さまざまな用途に活躍する  
蛍光タンパク質ベクター



# Living Colors® & Fruit 蛍光タ

## Living Colors® & Fruit 蛍光タンパク質ってなに?

生命科学分野では複雑な生理現象を分子レベルで理解するために、蛍光タンパク質を利用したイメージング技術が重要なツールのひとつとなっています。Clontechでは、可視光領域を広範にカバーする様々な色調のLiving Colors®蛍光タンパク質シリーズと、長波長域に蛍光波長をもつFruit蛍光タンパク質シリーズを用意しています。Living Colors®シリーズはサンゴ由来(RCFP)やクラゲ由来の蛍光タンパク質およびその変異体で、藍色、緑色、黄色、赤色、深赤色の9種類が揃っています。FruitシリーズはRoger Tsien博士により開発された蛍光タンパク質で、単量体のDsRedバリエーションに変異を導入して得られたものです。



Living Colors®シリーズの励起および蛍光スペクトル

**A**: RCFP (Reef Coral Fluorescent Proteins: AmCyan, ZsGreen, ZsYellow, DsRed2, AsRed2, HcRed) **C**: DsRed-MonomerとAcGFP1  
DsRed-Expressのスペクトル(図示していません)はDsRed2に類似しています。それぞれの極大波長(nm)は、以下の「蛍光タンパク質の特性」の表でご確認ください。

## Living Colors® & Fruit 蛍光タンパク質の特性

蛍光タンパク質	色調	励起極大波長 (nm)	蛍光極大波長 (nm)	構造	量子収率 <sup>a</sup>	モル吸光係数 (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	蛍光強度 <sup>c</sup>	推奨フィルターセット <sup>d</sup>
mPlum	far red	590	649	単量体	0.10 <sup>f</sup>	41,000 <sup>f</sup>	4,100	C.T. 41043
mRaspberry	far red	598	625	単量体	0.15 <sup>f</sup>	86,000 <sup>f</sup>	12,900	C.T. 41043
HcRed1	far red	588	618	2量体	0.03	20,000	600	C.T. 41043; Omega XF102-2
mCherry	red	587	610	単量体	0.22 <sup>g</sup>	72,000 <sup>g</sup>	15,840	C.T. 49008; Omega XF102-2
mStrawberry	red	574	596	単量体	0.29 <sup>g</sup>	90,000 <sup>g</sup>	26,100	C.T. 42004 & 42005
AsRed2	red	576	592	4量体	0.21	61,000	12,810	C.T. 42004 & 42005
DsRed-Monomer	red	556	586	単量体	0.20	16,100	3,220	C.T. 41002c & 42005
DsRed2	red	563	582	4量体	0.55	43,800	24,090	C.T. 41002c & 42005
tdTomato	red	554	581	タンデム2量体	0.69	138,000	95,220	C.T. 41002c & 42005
DsRed-Express	red	557	579	4量体	0.90	19,000	17,100	C.T. 41002c & 42005
mOrange	orange	548	563	単量体	0.69 <sup>g</sup>	71,000 <sup>g</sup>	48,990	C.T. 49010
mBanana	yellow	540	553	単量体	0.70 <sup>g</sup>	6,000 <sup>g</sup>	4,200	C.T. 42003 & 41028
ZsYellow1	yellow	529	539	4量体	0.65	20,000	13,000	C.T. 42003 & 41028
ZsGreen1	green	493	505	4量体	0.91	43,000	39,130	C.T. 42002 & 41017
AcGFP1	green	475	505	単量体	0.82	32,500	26,650	C.T. 42002 & 41017
AmCyan1	blue	458	489	4量体	0.75	39,000	29,250	C.T. 42001 & 41014
EYFP <sup>e</sup>	yellow	512	529	単量体	0.54	45,000	24,300	
EGFP <sup>e</sup>	green	484	510	単量体	0.70	23,000	16,100	
ECFP <sup>e</sup>	blue	439	476	単量体	0.15	20,000	3,000	

<sup>a</sup> Unless otherwise specified (see footnotes f and g), the Relative Quantum Yield of each fluorescent protein (Q<sub>FP</sub>) was determined using the following equation:

$Q_{FP} = (Q_{fluor} \cdot F_{FP} \cdot OD_{fluor}) / (F_{fluor} \cdot OD_{FP})$ , where F is the fluorescence and OD is the optical density of either the fluorescent protein (FP) or the reference fluorophore (fluor).

<sup>b</sup> Unless otherwise specified (see footnotes f and g), the Molar Extinction Coefficient (ε) for each protein was determined as follows:  $A = \epsilon \cdot c \cdot l$  (Beer-Lambert law) or  $\epsilon = A/c$ , where A = absorbance, c = concentration (determined by the Bradford Protein Assay), l = path length (1 cm). Each molar extinction coefficient was determined at the absorption maxima of its respective protein.

<sup>c</sup> Brightness = (Quantum Yield)(Extinction Coefficient)

<sup>d</sup> C.T. = Chroma Technologies

<sup>e</sup> For reference only; not sold by Clontech

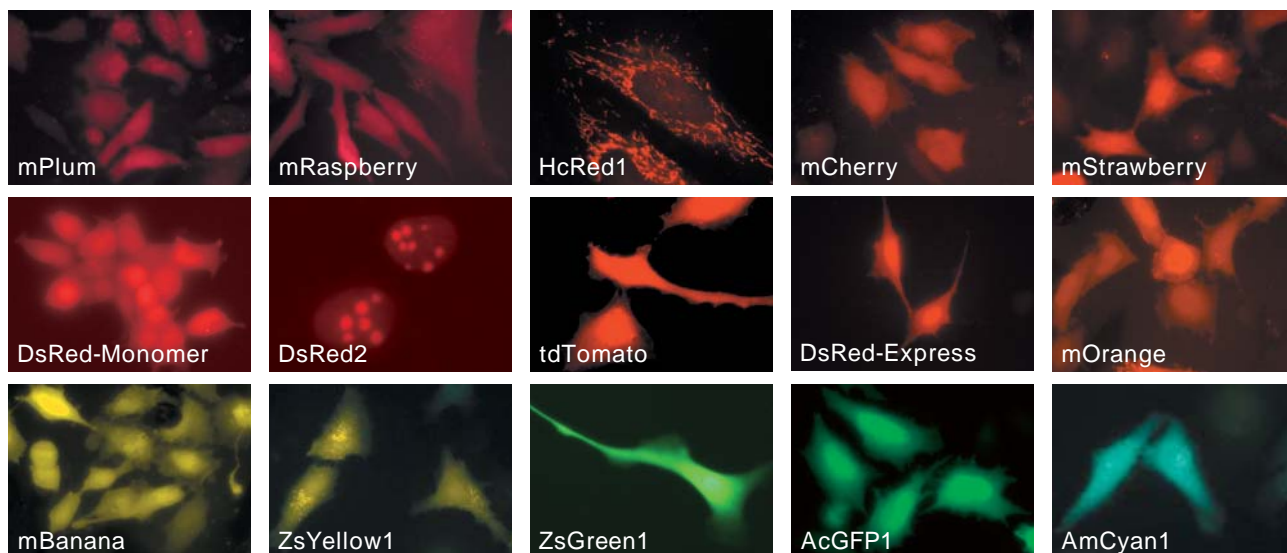
<sup>f</sup> Wang, L. et al. (2004) Proc. Nat. Acad. Sci. 101(48):16745-16749.

<sup>g</sup> Shaner, N. C. et al. (2004) Nature Biotechnol. 22(12):1567-1572.

マークはFruitシリーズの蛍光タンパク質(マークがないものはLiving Colors®シリーズ)

# 蛍光タンパク質の特徴まるわかりガイド

Clontech社の蛍光タンパク質は可視光領域を広範囲にカバー

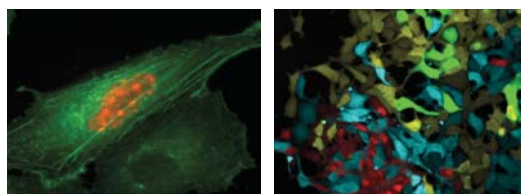


## アプリケーション別のおすすめ蛍光タンパク質リスト

アプリケーション	推奨蛍光タンパク質	備考	ベクターフォーマット	掲載ページ
融合タンパク質として発現	AcGFP1 DsRed-Monomer mCherry	単量体蛍光タンパク質を用いることで、融合したターゲット遺伝子への影響が軽減される。	A	3
プロモーター活性のレポーター	DsRed2 ZsGreen1 ZsYellow1	プロモーターの活性化研究に有用なプロモーターレスベクターには、レポーター分子として理想的な強い蛍光強度を示す蛍光タンパク質を使用	B	5
細胞標識、イメージング	DsRed-Express ZsGreen1 mCherry mOrange AmCyan1	可視光領域全体をカバー。波長特性の異なる蛍光タンパク質の組み合わせで多重染色が可能 フィルターや解析機器の特性に合わせて選択してください。	C	3
プロテアソーム活性測定	ZsProSensor	Proteasomeセンサーベクターはプロテアソームの活性を可視化。活性に影響を与える化合物の検出に便利	E	6
細胞内小器官の標識	AcGFP1 DsRed-Monomer DsRed2 mCherry HcRed1	局在化タグをもつ蛍光タンパク質で細胞内小器官を標識し可視化 ゴルジ体 小胞体 アクチンフィラメント ミトコンドリア 形質膜 ペルオキシソーム 核 エンドソーム 微小管	C	3
動植物個体内での発現、 <i>in vivo</i> イメージング	tdTomato mPlum HcRed1 mCherry	橙赤～深赤色の蛍光タンパク質は動植物の持つ自家蛍光の影響を受けにくく、 <i>in vivo</i> イメージングに最適。GFP緑色タイプも多種の生物個体で使用例があるが自家蛍光などに注意が必要	A,B,D	7, 8
遺伝子発現細胞の選別	DsRed-Express ZsGreen1	バインストロニック(IRES)ベクターでは、導入したターゲット遺伝子と蛍光タンパク質が同一のmRNAから同時に翻訳されるため、常にレポーター発現とターゲット遺伝子発現が同調している。発現クローンの選択や形質転換効率のモニターに有用	F	4
細菌内発現	GFPuv	GFPuv( <i>Aequorea victoria</i> 発光クラゲ由来GFPのバリエーション)は長波長UV(360-400 nm)照射下で強い蛍光を示す。	D	6
発現カイネティクスアッセイ	HcRed1-DR DsRed-Express-DR ZsGreen1-DR	不安定化蛍光タンパク質は速やかに分解し、残存する蛍光の影響を受けずに新たな遺伝子発現の変動を検出可能	B	5
遺伝子発現の経時的追跡	pTimer Vectors	時間経過と共に蛍光の色彩が変化し転写活性の変動を検出可能	B,D	5
タンパク質間相互作用の検出(FRET)	AcGFP1 and DsRed-Monomer AcGFP1 and mCherry mOrange and mStrawberry mOrange and mCherry	最適なFRET解析の組み合わせはドナーに高い量子収率をもち、アクセプターには高いFörster radius( $R_0$ )を持つ蛍光タンパク質分子が理想的	A,D	8

### ベクターフォーマット

- A: N末端、C末端融合発現ベクター( pFP\_N1, pFP\_C1; pAcGFP1\_N1, pAcGFP1\_C1など)
- B: プロモーターレスベクター( pFP\_1; pDsRed2\_1など)
- C: 細胞内小器官標識ベクター( pFP\_Structure; pAcGFP1\_Actinなど)
- D: 細菌発現ベクター、または遺伝子ソースとして使用( pFP; pZsGreenなど)
- E: Proteasome Sensorベクター( pZsProSensor 1 )
- F: IRESベクター( piRES2\_FF; piRES2\_AcGFP1など)



# 目的遺伝子の機能解析にはClontech

## Living Colors® および Fruit 蛍光タンパク質ベクターの選択ガイド

(各種ベクターの製品名、製品コードなどは本パンフレットの最終面の製品一覧にてご確認ください。)

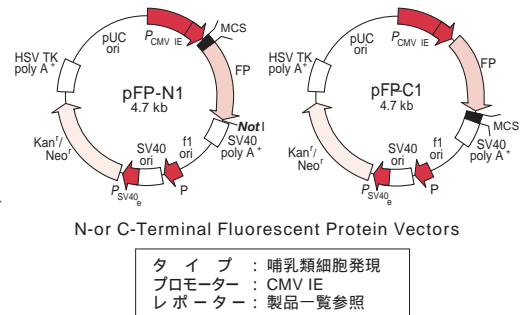
### 哺乳類細胞の汎用レポーター!

#### N末端、C末端融合蛍光タンパク質ベクター

目的遺伝子をベクターのマルチクローニングサイト(MCS)に読み枠を合わせて挿入すると、蛍光タンパク質(FP)のN末端またはC末端側に融合されて発現します。

#### こんな実験におすすめ!

- ・トランスフェクション効率をモニタリング  
目的遺伝子が導入された細胞が光るため、蛍光強度でトランスフェクション効率をモニタリングすることができます。
- ・目的タンパク質の発現確認・局在化の研究  
目的タンパク質の発現の有無や融合タンパク質がどこに局在発現するかを調べられます。



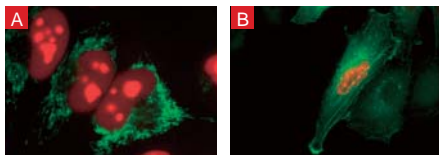
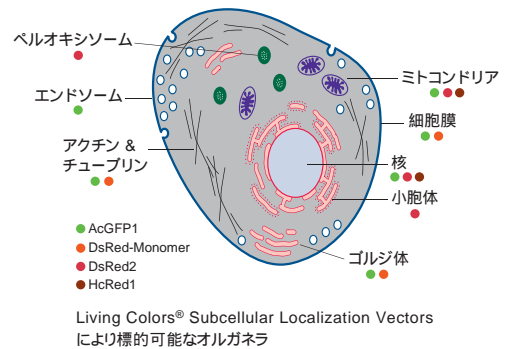
### 生細胞中の細胞骨格や小器官の構造・機能を調べたい...

#### 細胞内局在化ベクター Living Colors® Subcellular Localization Vectors

局在化シグナル、または、細胞内構造タンパク質と融合した蛍光タンパク質をコードしています。特定のオルガネラを可視化できるready to useのベクターです。

#### こんな実験におすすめ!

- ・細胞内構造の解析や細胞周期のモニタリング  
化学染色や基質・補因子添加を行うことなく、細胞内の細胞骨格や細胞小器官の構造をリアルタイムに観察することができます。
- ・同一細胞内で異なる色の蛍光タンパク質を用いて多重染色が可能  
同じ細胞に、2つ以上の異なる蛍光タンパク質の局在化ベクターを導入し、細胞の特定器官をそれぞれ標識して視覚化できます。



AcGFP1とDsRed2を用いた二重染色例  
パネルA: ミトコンドリア局在化配列を付加したAcGFP1および核移行シグナルを付加したDsRed2のHEK 293細胞での発現  
パネルB: アクチンとAcGFP1との融合タンパク質およびラミンBとDsRed-Monomerとの融合タンパク質のHeLa細胞での発現

### ベクターの見方ワンポイントアドバイス

Clontech社の蛍光タンパク質ベクターの名前には、こんなルールがあります!

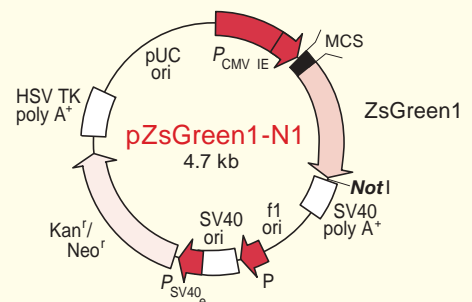
【例】哺乳類発現用 pZsGreen1-N1ベクター(製品コード 632448)の場合

ZsGreen1の数字1: サンゴの野生型蛍光タンパク質遺伝子配列を改変し、使用コドンにヒト化していることを示します。

一方、pZsGreenベクター(製品コード 632446)は大腸菌用発現ベクターで、コドンがヒト化されていないため、哺乳類細胞中では発現量が低くありません。pDsRed2ベクター(製品コード 632404)の場合、ヒトコドン最適化が行われ、さらに改良が加えられていることを数字2で示しています。なお、細菌中では異種生物コドン頻度でも高レベルに発現します。

-N1: ZsGreen1遺伝子のN末側にマルチクローニングサイトがあることを示しています。本ベクターに目的遺伝子を導入する際には、開始コドンが必要です。また、ストップコドンは除き、読み枠(フレーム)をZsGreen1に正しく合わせてください。通常開始コドンに合わせてKozak配列に改変することをお勧めしますが、必須ではありません。本ベクターは大腸菌でクローニング操作を行います(細菌中では緑色蛍光を発生しません)。

\*: AcGFP1ベクターで見られる-N1, N2, N3の表記は、クローニングサイトを後ろのAcGFP1遺伝子の読み枠に対して1塩基ずつずらした同じ構造のベクターであることを表しています。



各ベクターにはVector Information Packet, Living Colors User Manual(PT2040-1)またはLiving Colors User Manual, Volume II(PT3404-1)が添付されています。

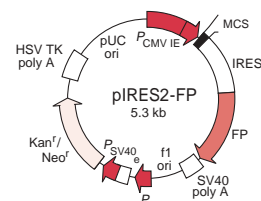
# の蛍光ベクターをご利用ください!

## 目的遺伝子安定発現細胞株を簡単・確実に選択したい・・・

### IRES蛍光タンパク質発現ベクター

目的遺伝子と蛍光タンパク質を1つのプロモーターで共発現可能!

本ベクターでは、目的遺伝子と蛍光タンパク質(マーカー)はIRES(Internal ribosomal entry site)を介して1種類のmRNAから翻訳されます。すなわち、目的遺伝子はマーカーと共に同一のプロモーターから発現されるため、マーカーを発現するほぼ100%の細胞は、目的遺伝子も発現しています。また、目的遺伝子と蛍光タンパク質は融合タンパク質としてではなく、個々のタンパク質として発現するため、生理活性に影響を与えません。



Fluorescent IRES Bicistronic Expression Vectors

タイプ : 哺乳類細胞発現  
プロモーター : CMV IE  
レポーター : 製品一覧参照

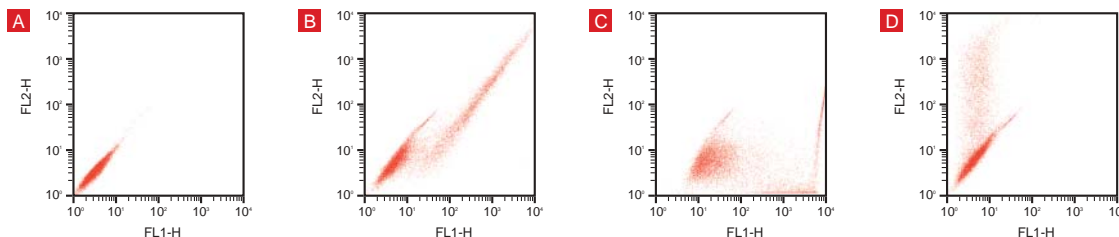
#### こんな実験におすすめ!

##### 安定発現細胞の選択

マーカーを発現するほぼすべての細胞が目的遺伝子も発現するため、より少ないコロニーのスクリーニングで、目的遺伝子の高発現株が得られます。

##### 蛍光による細胞選択

哺乳類細胞で1つの転写産物から目的遺伝子と蛍光タンパク質の両方を発現するので、フローサイトメリーで簡単に選別することができます。



pIRES2-ZsGreen1 VectorのIRESを介した同時発現をフローサイトメリーにて確認  
pIRES2-ZsGreen1 VectorのマルチクローニングサイトにDsRed-Expressタンパク質をコードする遺伝子を組み込み、細胞に導入しました。

パネルA : トランスフェクションしていないコントロール細胞

パネルB : トランスフェクションされた細胞は対角線上に分布し、ZsGreen1とDsRed-Expressを同時に発現していることが確認できる。

パネルC : ZsGreen1タンパク質のみを発現するコントロール細胞はFL-1チャンネルでのみ検出され、X軸に沿って分布が見られた。

パネルD : 別途用意したDsRed-Expressタンパク質のみを発現している細胞はFL-2チャンネルでのみ検出され、Y軸に沿って分布が見られた。

ここで用いられたサンプルは、波長488 nmのレーザー光を用い、FACSCalibur Flow Cytometerで解析した。

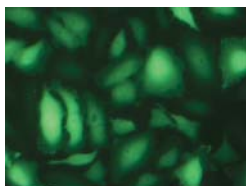
## RNA干渉実験、ウイルス発現系のマーカーには・・・

### 蛍光RNAi Ready pSIRENベクター

### 蛍光タンパク質融合発現レトロウイルスベクター / レンチウイルスベクター

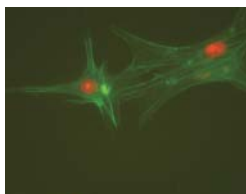
### AcGFP1発現アデノウイルスほか

通常のベクターに加え、RNAi、レトロウイルス、アデノウイルス、レンチウイルスの実験に最適な蛍光タンパク質ベクターも各種取りそろえています。詳細はクロンテックカタログまたはウェブサイトをご覧ください。



Adeno-X™ AcGFP1 Marker Virusを感染させたHeLa細胞

感染多重度(MOI)=10でHeLa細胞に感染を行い、48時間インキュベーション後、フィルターセット(FITC/EGFP)を装着した蛍光顕微鏡(Zeiss社Axioskop)により視覚化



ヒト神経前駆細胞へのDsRed-Monomer-Nuc発現レンチウイルスおよびAcGFP-Actin発現レンチウイルスの同時、等量(MOI)感染例

神経球をラミニン上で分化させ、DsRed-MonomerおよびAcGFP1を発現するレンチウイルスを共感染させた。アクチンとAcGFP1の融合タンパク質は細胞骨格をはっきりと可視化させている。またDsRed-Monomerの核への局在が、それぞれの細胞の位置を明確に示している。

# 目的遺伝子の機能解析にはClontech

## プロモーター活性の研究に・・・

### プロモーターレス蛍光タンパク質ベクター

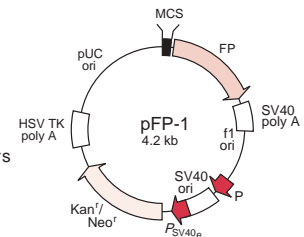
蛍光タンパク質コード配列の上流に位置するMCS内に、プロモーターあるいはプロモーター/エンハンサーを組み合わせて挿入し、それらによる転写を観察します。

こんな実験におすすめ!

プロモーター活性の解析

Promoterless Fluorescent Protein Vectors

タイプ：哺乳類細胞発現  
レポーター：製品一覧参照



### プロモーターレス不安定化蛍光タンパク質ベクター

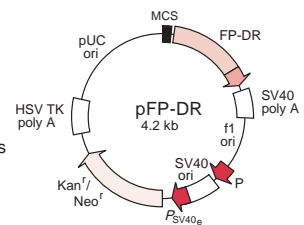
不安定化蛍光タンパク質(FP-DR)コード配列の上流に位置するMCS内に、プロモーターあるいはプロモーター/エンハンサーを組み合わせて挿入し、それらによる転写を観察します。不安定化蛍光タンパク質変異体は、代謝回転率が速く、半減期が短いという特長があります。

こんな実験におすすめ!

定量レポーターアッセイや速度論的研究

Destabilized Fluorescent Protein Vectors

タイプ：哺乳類細胞発現  
レポーター：製品一覧参照



### 蛍光タイマーベクター

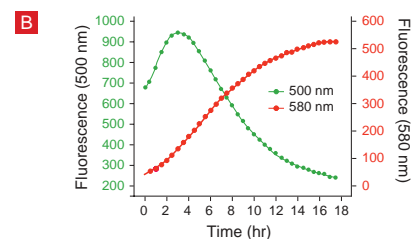
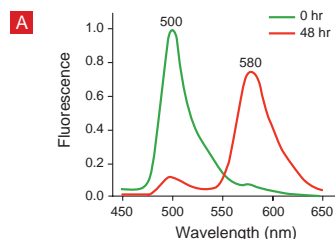
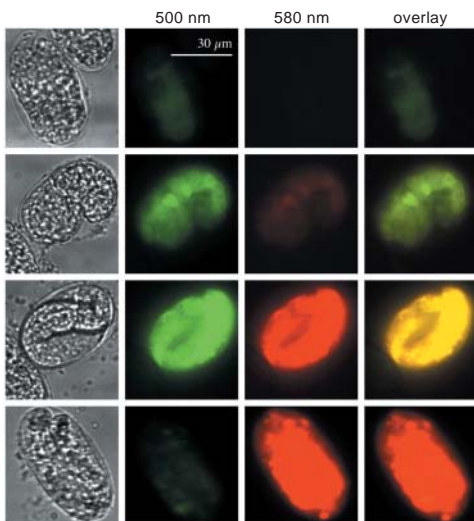
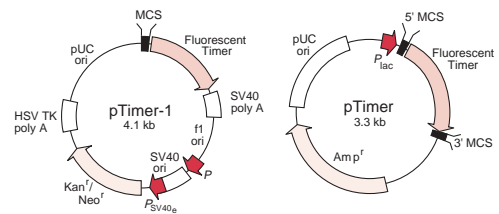
このベクターは、2つのアミノ酸置換を含むDsRed変異体(蛍光タイマー)をレポーターとしています。合成直後は緑色の蛍光を発生し、時間が経過して成熟したタンパク質になると赤色に変化します。フローサイトメトリーや蛍光顕微鏡で検出が可能です。

こんな実験におすすめ!

プロモーター調節をリアルタイム分析

Fluorescent Timer Vectors

タイプ：哺乳類細胞・細菌系発現



Fluorescent Timerは時間経過に伴い緑色から赤色に変化。パネルA *E. coli*一晚培養から新たに単離してすぐの精製Fluorescent Timerタンパク質は500 nm (緑色)の蛍光を発生しますが、単離から48時間後には580 nm (赤色)の蛍光を発生ようになります。パネルB 各時点における緑色および赤色放射の測定値。

#### 蛍光タイマーによるプロモーター活性変化の可視化

熱ショックプロモーター-*hsp14 61*を含む蛍光タイマーベクターを導入した*C. elegans*トランスジェニック胚を33 °Cの水浴に浮かべ、熱ショックを与えた後、熱ショック後の回復期にプロモーター活性を解析した(上から、2時間後、5時間後、10時間後、50時間後)。画像はChroma Polycroichビームスプリッター86100bsフィルターセットを使用して撮影し、MetaMorph Software( Universal Imaging )を用いて解析した。緑色と赤色の両方の蛍光が存在する場合、2つの色の重なりの部分は黄色で表わされる。

## Living Colors® シリーズ Q&A

### Q1 蛍光タンパク質とはどのようなものか?

A1 AcGFPはクラゲ由来の蛍光タンパク質、ZsGreenやDsRedなどはサンゴ由来の蛍光タンパク質(RCFP: Reef Coral Fluorescent Protein)です。折り畳まれたシートのパレル状構造内部に蛍光発色団を持つ安定な三次構造を形成するため、各種プロテアーゼに耐性を示すなど化学的に非常に安定なことが知られています。pH5-12の間で蛍光が見られ、凍結融解したものや70 °C程度に加熱したものでも蛍光が損なわれません。Clontechの蛍光タンパク質は天然由来のものに変異を加えることで、溶解度を高め、細胞毒性を抑制したほか、蛍光強度を改善することに成功しました。また遺伝子配列を置換し哺乳類のコドン使用頻度に最適化してあるため、ヒト細胞内で効率よく発現させることが可能です。

### Q2 蛍光タンパク質でなにができるのか?

A2 Clontechの蛍光タンパク質シリーズの最大の特長は、他の色素と異なり、細胞を生きたままの状態でも染色し観察することができる点です。また、安定した分子構造を持つため、固定した細胞でも蛍光を観察することができます。蛍光顕微鏡やフローサイトメトリーを用いることで蛍光を容易に検出、識別でき、肉眼でそのまま観察することも可能です。遺伝子発現マーカーや転写レポーター、遺伝子発現局在を調べるタグなどとして盛んに利用されています。

### Q3 目的タンパク質と蛍光タンパク質を融合させたいが・・・?

A3 目的遺伝子を蛍光タンパク質に融合して発現させる場合には、単量体でかつ強い蛍光を示すDsRed-MonomerやAcGFP1、mCherryをお勧めします。これらは、N末またはC末に他の遺伝子をつないだ融合タンパク質として発現させても蛍光が損なわれません。

# の蛍光ベクターをご利用ください!

## プロテアソーム活性の測定には・・・

### プロテアソーム活性レポーターベクター

プロテアソーム感受性蛍光タンパク質ZsProSensor-1を発現するように設計されています。通常は、翻訳直後にプロテアソームの標的となるため、ほとんどは蛍光を発する前に分解されてしまいます。プロテアソームの阻害が起きると、ZsProSensor-1はただちに蓄積し蛍光が増大します。

#### こんな実験におすすめ!

プロテアソーム活性をリアルタイムにモニタリング  
プロテアソーム阻害剤の研究

### プロテアソーム活性測定用細胞株

プロテアソーム活性レポーターベクター導入済の細胞株(HEK 293 細胞)です。

#### こんな実験におすすめ!

ハイスループットスクリーニング

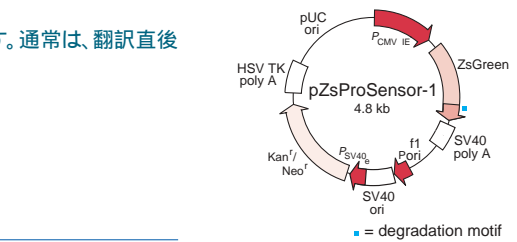


未処理

ALLN処理

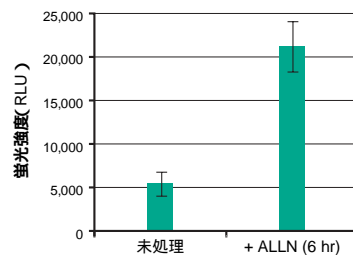
蛍光顕微鏡で観察したプロテアソーム活性

HEK 293 ZsGreen Proteasome Sensor Cells をALLN(プロテアソーム阻害剤)10 μMで処理し、6時間後にZsProSensor-1タンパク質の緑色蛍光を顕微鏡で観察した。解析にはZeiss社Axioskopを使用し、各蛍光発色団の露光時間を一定にし、GFPの場合と同じフィルターを使用して顕微鏡写真を撮影した。



Proteasome Sensor Vector

タイプ：哺乳類細胞発現



プレートリーダーを使用したプロテアソーム活性の測定

96穴プレートでHEK 293 Proteasome Sensor Cellsを培養し、ALLNで6時間処理した。BMG LABTECH POLARstarプレートリーダーの490/10励起フィルターおよび545/10蛍光フィルターを使用し、処理細胞および未処理細胞のZsProSensor-1の緑色蛍光を測定した。

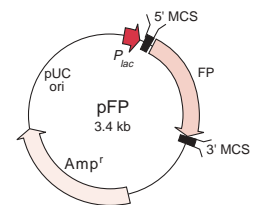
## 大腸菌でアッセイをしたいときは・・・

### 蛍光タンパク質ベシックベクター

大腸菌用の蛍光タンパク質発現ベクターですが蛍光タンパク質コード配列の供給源としても使用できます。PCRで増幅し、両脇の制限酵素サイトをを用いて容易に切り出すことができます。お好みのベクターに乗せてアッセイ可能です。

Basic Fluorescent Protein Vectors

タイプ：細菌系での発現または  
遺伝子供給用ベクター  
プロモーター：*lac*  
レポーター：製品一覧参照



Q4 蛍光は遺伝子導入後どのくらいの時間で観察されるか?

A4 導入された蛍光タンパク質は翻訳後すぐに蛍光を発するのではなく、酸素分子の存在下で徐々に発色団を形成しています。細胞のもつ自家蛍光にもよりますが、哺乳動物細胞にトランスフェクション後、早いもので約5時間、遅いものでも約72時間で自家蛍光と識別できる蛍光の観察が可能になります。細胞内での半減期は24時間以上で、比較的安定に存在します。また、長期間観察したい場合は、安定に形質導入することも可能です。これまでたくさんのトランスジェニックアニマルや組換え体の植物が作られてきました。

Q5 蛍光タンパク質関連製品を購入する際にどのような手続きが必要か?

A5 **非営利目的**の研究施設または法人の方は、蛍光タンパク質のご購入に際してライセンス確認書の提出が必要になります。ご記入の上、取引先代理店の営業担当者にお渡しください。

**営利目的**の研究施設または法人の方は、使用目的に関わらず、ご購入に際してClontech社からライセンスを取得する必要があります。Clontechではよりご利用しやすくなった新しいライセンスプログラムをご用意しており、1種類の蛍光タンパク質からライセンスを取得することができます。また、一括で複数色のライセンスを取得することで、コストを軽減できるライセンスプログラムもご用意しています。ライセンスの詳細についてご興味のある方は下記までお問合せください。

【お問い合わせ先】

タカラバイオ(株) 営業部 TEL 077-543-7231

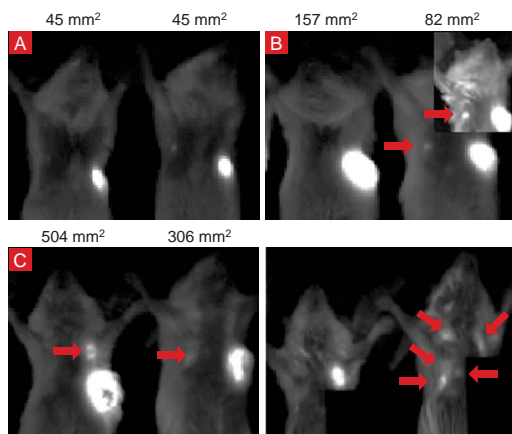
# アプリケーション

## in vivoイメージング

### 赤色蛍光タンパク質tdTomatoを用いたSCIDマウスでのがん転移のモニタリング

tdTomatoの示す波長特性と強い蛍光は、生きた動物個体内でのイメージングに理想的です。

SCIDマウスにtdTomatoを発現する乳がん細胞(MDA MB 231 tdTomato)を移植し、病巣の成長と転移を調べた実験例では、表皮から約1cmの部分においてもtdTomatoの蛍光シグナルを検出でき、極めて小さな転移病巣も検出、追跡できました。生体へのダメージも極めて軽微なため、繰返しの観察が可能です。



#### tdTomatoを用いたがん病巣の成長、転移のモニタリング

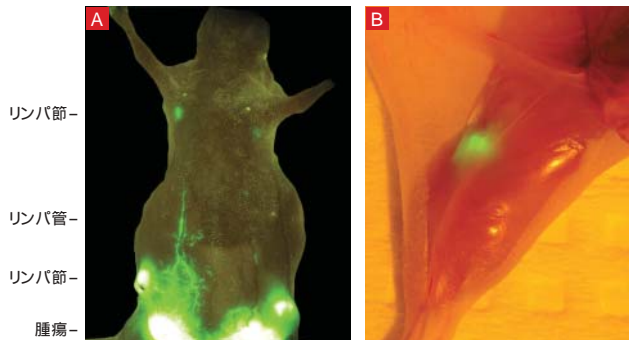
8週齢のSCIDマウスの第一、あるいは第二乳房脂肪体に $2 \times 10^6$ 個のMDA-MB-231-tdTomato乳がん細胞を移植し、腫瘍の成長、転移をモニターした。

移植から2週間後、移植部分でわずかに蛍光シグナルがスポットとして検出され、移植から3週間後には小さな腫瘍(約 $45 \text{ mm}^3$ )が容易に観察できるようになった(パネルA:露光時間1秒)。8週間後には、 $82 \text{ mm}^3$ の小さな原発巣でさえ、転移(矢印)を引き起こす様子が確認された(パネル B:露光時間1秒、枠内は5秒)。移植から13週間後、部分的に壊死したがん組織が蛍光シグナルを失っていたが、対となる乳房脂肪体にはシグナルが観察され、腋窩リンパ節にも転移が確認された。また、胸膜/肺への転移も確認できた(パネルC:露光時間左1秒/右2.5秒)。

< Reference >

Winnard Jr., P. T. et al. (2006) *Neoplasia* 8(10):796-806.

### 蛍光タンパク質ZsGreen1で乳がん細胞の転移をモニタリング

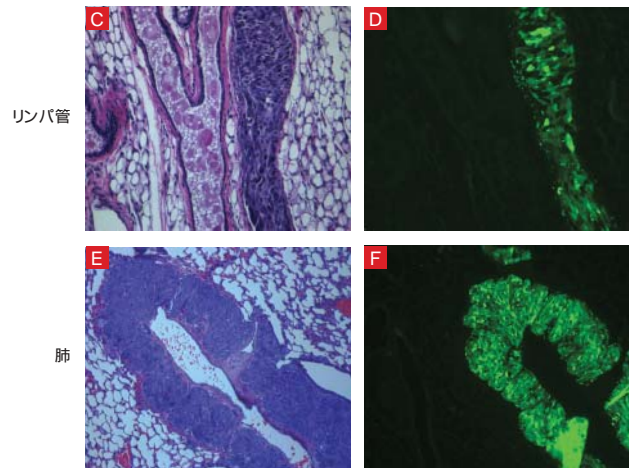


蛍光タンパク質を安定に発現するヒト乳がん由来MCF7細胞(エストロゲンレセプター陽性)を用いて、マウス個体内でのがん転移や浸潤をモニターした実験例を紹介いたします。

卵巣摘出マウスの乳腺に移植したMCF7(+ZsGreen1)が成長し、リンパ節に転移した様子をZsGreen1でモニターした例が示されています。また、マウス循環系に直接導入したMCF7 ZsGreen1が、骨、脳、副腎などの各臓器に転移した様子も観察されました。

パネルA: マウス個体/全身の蛍光写真。マウス乳腺に移植したヒト乳がん由来MCF7-ZsGreen1細胞の成長と、リンパ管、リンパ節への転移が観察された。

パネルB: マウスの左心室に導入したMCF-ZsGreen1細胞が骨に転移している様子を示す。



#### 組織染色と蛍光顕微鏡によるがん転移の確認

マウス乳腺と肺は4%パラホルムアルデヒドで固定しパラフィン包埋し、連続切片を作製した。顕微鏡、または蛍光顕微鏡下で観察した。

パネルC,D: 乳腺内のリンパ管へのがん転移

パネルE,F: 肺へのがん転移

< Reference >

Harrell, J. et al. (2006) *Cancer Res.* 66(18):9308-9315.

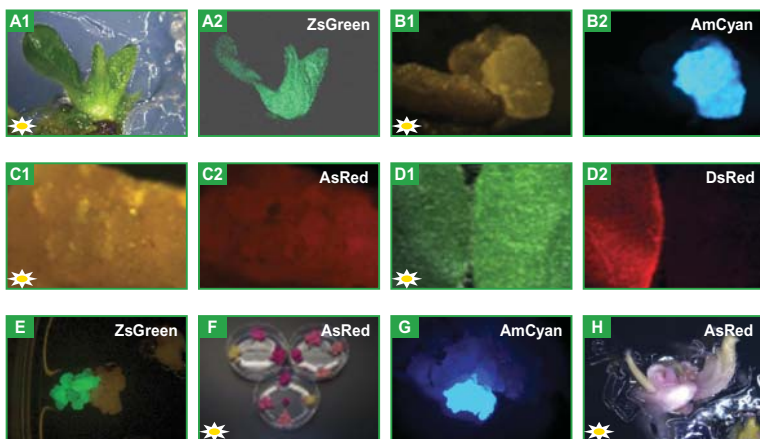
ヘマトキシリン、エオシン染色

ZsGreen1

# アプリケーション

## 植物での利用

植物には自家蛍光の少ない長波長領域のAsRed、DsRedバリエーションなどがおすすめです。



一般的に蛍光タンパク質の可視化には蛍光顕微鏡をしますが、トウモロコシやイネの培養物ではAsRed、ZsYellow、AmCyanを白色光の下でも確認でき、トウモロコシのカルスではDsRedを白色光の下でも確認できます。なお、植物は自家蛍光を示す内在化合物が多くGFPの利用波長領域では緑～黄色の自家蛍光が問題になることがあるため、長波長領域を利用する赤色蛍光タンパク質、AsRedやDsRedバリエーションの使用をお勧めします。

形質転換した植物組織での蛍光タンパク質発現の様子  
大豆 (A1,A2)、綿カルス (B1,B2,C1,C2)、タバコ (D1,D2)、米カルス (E,F)、トウモロコシカルス (G,H)

( マーク...白色光で撮影 マークなし...蛍光顕微鏡で撮影)

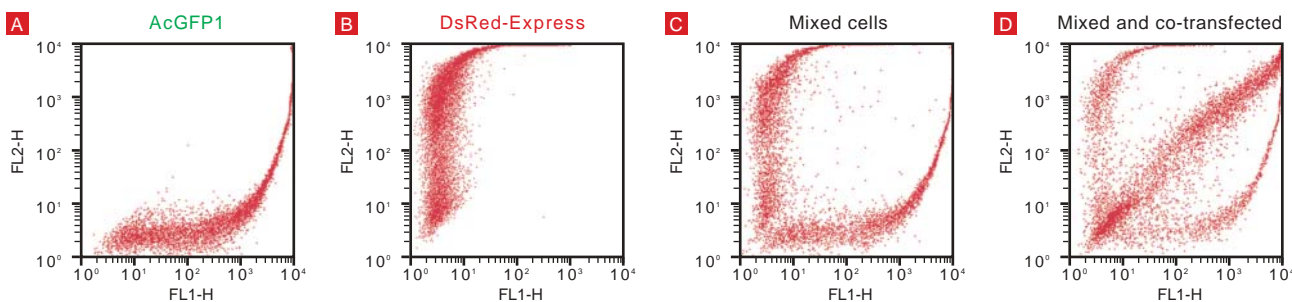
植物で用いる場合は、蛍光タンパク質ベクターから遺伝子(ORF)を切り出し、植物用のベクターに載せ換えてご使用ください。

<References>

- Wenck, A., et al. (2003) *Plant Cell Rep.* 22(4):244-251.
- Clontech 2006年秋号: 26 ~ 28ページ

## フローサイトメトリー解析

蛍光タンパク質ベクターに目的遺伝子をクローニングし細胞に導入することで、目的遺伝子を持つ細胞だけをフローサイトメトリーなどを用いて濃縮することができます。



蛍光タンパク質を発現した細胞はフローサイトメトリーで容易に検出可能  
HEK 293細胞に蛍光タンパク質発現ベクターをトランスフェクトし24時間後にフローサイトメトリーで検出した。

パネルA : pAcGFP1発現ベクターのみ

パネルB : pDsRed Express発現ベクターのみ

パネルC : pAcGFP1またはpDsRed Expressを発現する二つの細胞集団を解析の前に混合した。

パネルD : 細胞にpAcGFP1およびpDsRed Express発現ベクターをコトランスフェクトした。さらにパネルCの混合物を添加して解析に用いた。対角線に沿ってコトランスフェクトした細胞集団が検出された。

## FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) 解析例

Clontechの蛍光タンパク質を用いてFRET解析を行った実験も報告されています。下記Referenceをご参照ください。

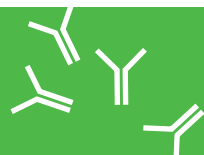
### 【AcGFP1 : DsRed Monomer】

•Liu, B. F., et al. (2007) *Mol. Vis.* 13:845-861.  
Confocal fluorescence resonance energy transfer microscopy study of protein protein interactions of lens crystallins in living cells.

•Helen J., et al. (2008) *J Virol.* 82(10):5007-20.  
CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry.

### 【mOrange : mCherry, mOrange : mStrawberry】

•Goedhart, J., et al. (2007) *PLoS ONE.* 2(10):e10111.  
Sensitive detection of p65 homodimers using red shifted and fluorescent protein based FRET couples.



# 検出もラクラク!

## ウェスタンブロット 免疫沈降法 免疫細胞化学

Clontechでは、蛍光タンパク質を検出する多彩なモノクローナル抗体やポリクローナル抗体を用意しています。各抗体は特異性を確認し、ロット間で一定の性能を保証するため入念に試験されていますので、安心してご使用いただけます。  
単独の蛍光タンパク質はもちろん、N末端、C末端融合タンパク質も検出可能です。

製品名	抗体の種類	製品コード	mPlum	mRaspberry	HcRed1	mCherry	mStrawberry	AsRed2
Anti RCFP Polyclonal Pan Antibody	ウサギポリクローナル血清	632475						
DsRed Polyclonal Antibody	ウサギポリクローナル血清	632496			x			x
DsRed Monoclonal Antibody <sup>1</sup>	マウスモノクローナル抗体	632393 632392			x			x
mCherry Monoclonal Antibody	マウスモノクローナル抗体	632543		x	未確認			未確認
Full Length ZsGreen Polyclonal Antibody	ウサギポリクローナル血清	632474	x	x	x	x	x	x
Full Length A.v. Polyclonal Antibody	ウサギポリクローナル血清 <sup>2</sup>	632459 632460	x	x	x	x	x	x
GFP Monoclonal Antibody	マウスモノクローナル抗体	632375	x	x	x	x	x	x
A.v. Peptide Antibody( polyclonal )	ウサギポリクローナル抗体 <sup>3</sup>	632377 632376	x	x	x	x	x	x
A.v. Monoclonal Antibody( JL 8 )	マウスモノクローナル抗体	632380 632381	x	x	x	x	x	x

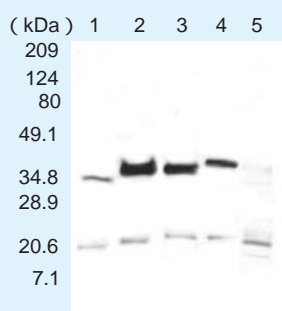
1 : DsRed Monoclonal Antibodyは、DsRed-Monomer に使用できません。

2 : 完全長GFPタンパク質を用いて作製

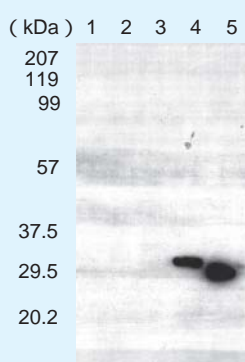
3 : 3種類のアフィニティー精製したGFPペプチド抗体を混合して作製

## ウェスタンブロットによる検出例

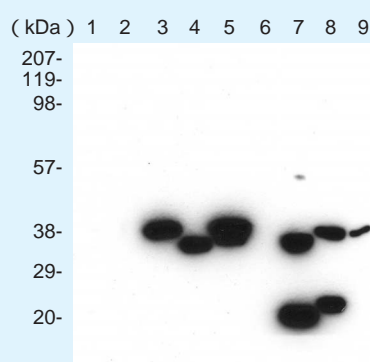
### A DsRed Monoclonal Antibody



### B DsRed Polyclonal Antibody



### C Anti-RCFP Polyclonal Pan Antibody



・パネルA : HeLa細胞に以下のベクターを一過性にトランスフェクトし、DsRed Monoclonal Antibodyを用いたウェスタンブロットにより解析した。

- 1 : pDsRed2 N1
  - 2 : pDsRed2 C1
  - 3 : pDsRed2 Mit0(N末端融合)
  - 4 : pDsRed2 Nu0(C末端融合)
  - 5 : 対照(トランスフェクトしていない細胞)
- 反応時間を延長すると、20 kDaの非特異的バンドが現れます。

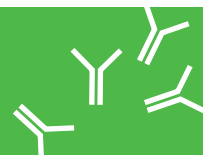
・パネルB : HEK 293細胞に以下のベクターをトランスフェクトして安定発現株を作製し、DsRed Polyclonal Antibodyを用いたウェスタンブロットにより解析した。

- 1 : recombinant AcGFP1 Protein
- 2 : pAcGFP1
- 3 : 対照(トランスフェクトしていない細胞)
- 4 : pDsRed Monomer N1
- 5 : pDsRed Express N1

下記に示す蛍光タンパク質を安定発現させたHEK 293細胞株の細胞溶解物に対して、1,000倍希釈したAnti RCFP Polyclonal Pan Antibodyを用いてウェスタンブロットを行った。各レーンには約35,000個の細胞分の溶解物を使用

- 1 : AcGFP1
- 2 : ブランク
- 3 : DsRed Express
- 4 : AmCyan1
- 5 : ZsGreen1
- 6 : コントロール(未トランスフェクション細胞)
- 7 : ZsYellow1
- 8 : AsRed2
- 9 : HcRed1

# 蛍光タンパク質抗体



抗体	アプリケーション
認識する	+++ 非常に優れている
交差性がある	++ 優れている
x 認識しない	+ 使用可能

DsRed-Monomer	DsRed2	tdTomato	DsRed-Express2	mOrange mOrange2	mBanana	ZsYellow	ZsGreen	AcGFP1、 EGFPなど	AmCyan	ウェスタン ブロット	免疫沈降	免疫細胞化学
未確認		x						x		+++	不適	不適
						x	x	x	x	+++	++	+ <sup>4</sup>
x						x	x	x	x	+++	不適	未確認
x	未確認	x	x			未確認	未確認	未確認	未確認	+++	未確認	未確認
x	x	x	x	x	x	x		x	x	+++	+++	不適
x	x	x	x	x	x	x	x		x	++	+++	不適
x	x	x	x	x	x	x	x		x	+++	不適	+
x	x	x	x	x	x	x	x		x	+++	++	+++
x	x	x	x	x	x	x	x		x	+++	++	+++

4: 弊社データはありませんが、下記の論文にて免疫細胞化学での使用例を参照できます

Mutually exclusive glomerular innervation by two distinct types of olfactory sensory neurons revealed in transgenic zebrafish. Sato, Y. Miyasaka, N. Yoshihara Y. *J Neurosci.* 2005;25(20):4889-97.

## 抗体価格リスト

製品名	容量	製品コード	価格
Anti RCFP Polyclonal Pan Antibody	100 µl	632475	¥49,000
DsRed Polyclonal Antibody	100 µl	632496	¥77,000
DsRed Monoclonal Antibody	20 µl	632393	¥30,000
	200 µl	632392	¥91,000
mCherry Monoclonal Antibody	100 µl	632543	¥73,000
Full Length ZsGreen Polyclonal Antibody	100 µl	632474	¥73,000

製品名	容量	製品コード	価格
Full Length A.v. Polyclonal Antibody	20 µl	632459	¥31,000
	100 µl	632460	¥73,000
GFP Monoclonal Antibody	100 µl	632375	¥95,000
A.v. Peptide Antibody (polyclonal)	200 µl	632377	¥27,000
	1 ml	632376	¥88,000
A.v. Monoclonal Antibody (JL 8)	20 µl	632380	¥31,000
	200 µl	632381	¥95,000

表示価格は全て税別です。

### Notice to Purchaser

#### For CMV Sequence

The CMV promoter is covered under U.S. Patent Nos. 5,168,062, and 5,385,839 assigned to the University of Iowa Research Foundation.

#### For IRES-containing Vectors

Use of the IRES sequence is covered by U.S. Patent No. 4,937,190 and is limited to use solely for research purposes.

Any other use of the IRES sequence requires a license from Wisconsin Alumni Research Foundation.

#### For pIRES2-ZsGreen1 Vector

The CMV promoter is covered under U.S. Patent Nos. 5,168,062, and 5,385,839 assigned to the University of Iowa Research Foundation.

Use of the IRES sequence is covered by U.S. Patent No. 4,937,190 and is limited to use solely for research purposes.

Any other use of the IRES sequence requires a license from the Wisconsin Alumni Research Foundation.

#### For DsRed-Express

Patent pending.

#### For DsRed-Monomer

This product is the subject of pending U.S. patent applications.

#### For DsRed-Monomer

This product is the subject of pending U.S. patent applications.

#### For Living Colors® Products

AcGFP1, DsRed, HcRed, AsRed, AmCyan, ZsGreen, ZsYellow and their variants:

Not-For-Profit Entities: Orders may be placed in the normal manner by contacting your local representative or Clontech Customer Service at 650.919.7300. At its discretion, Clontech grants Not-For-Profit Entities a non-exclusive, personal, limited license to use this product for noncommercial life science research use only. Such license specifically excludes the right to sell or otherwise transfer this product, its components or derivatives thereof to third parties. No modifications to the protein coding sequence may be made without express written permission from Clontech. Any other use of this product requires a license from Clontech. For license information, please contact a licensing representative by phone at 650.919.7320 or by e-mail at [licensing@clontech.com](mailto:licensing@clontech.com).

For-Profit Entities wishing to use this product are required to obtain a license from Clontech. For license information, please contact a licensing representative by phone at 650.919.7320 or by e-mail at [licensing@clontech.com](mailto:licensing@clontech.com).

This product is the subject of U.S. patents.

# Living Colors® & Fruit Fluorescent Proteins 製品一覧

選択マーカー 原核生物、真核生物、A:Ampicilin、K:Kanamycin、N:Neomycin、H:Hygromycin

製品名	容量	製品コード	選択マーカー	価格(税別)	
<b>蛍光タンパク質融合発現ベクター (蛍光タンパク質のN末端に融合)</b> 哺乳類細胞用 CMV IE プロモーター					
pAcGFP1-N1	各 20 µg	632469	K N	各 ¥88,000	
pAcGFP1-N2		632483	K N		
pAcGFP1-N3		632484	K N		
pAcGFP1-Hyg-N1	632489	A H			
pAcGFP1-N In-Fusion Ready	1 µg	632501	K N		
pZsGreen1-N1	各 20 µg	632448	K N		
pZsYellow1-N1		632445	K N		
pAmCyan1-N1		632442	K N		
pDsRed-Monomer-N1	各 20 µg	632465	K N		各 ¥126,000
pDsRed-Monomer-Hyg-N1		632494	A H		
pDsRed-Monomer-N In-Fusion Ready		1 µg	632498	K N	
pDsRed-Express2-N1	各 20 µg	632537	K N	各 ¥88,000	
pDsRed2-N1		632406	K N		
pAsRed2-N1		632449	K N		
pHcRed1-N1/1	各 20 µg	632424	K N	各 ¥112,000	
pmCherry-N1		632523	K N		
ptdTomato-N1		632532	K N		

製品名	容量	製品コード	選択マーカー	価格(税別)	
<b>蛍光タンパク質融合発現ベクター (蛍光タンパク質のC末端に融合)</b> 哺乳類細胞用 CMV IE プロモーター					
pAcGFP1-C1	各 20 µg	632470	K N	各 ¥88,000	
pAcGFP1-C2		632481	K N		
pAcGFP1-C3		632482	K N		
pAcGFP1-Hyg-C1	1 µg	632492	A H		
pAcGFP1-C In-Fusion Ready		632500	K N		
pZsGreen1-C1		各 20 µg	632447		K N
pZsYellow1-C1	632444		K N		
pAmCyan1-C1	632441		K N		
pDsRed-Monomer-C1	各 20 µg	632466	K N		各 ¥126,000
pDsRed-Monomer-Hyg-C1		632495	A H		
pDsRed-Monomer-C In-Fusion Ready		1 µg	632499	K N	
pDsRed-Express2-C1	各 20 µg	632538	K N	各 ¥88,000	
pDsRed2-C1		632407	K N		
pAsRed2-C1		632450	K N		
pHcRed1-C1	各 20 µg	632415	K N	各 ¥112,000	
pmCherry-C1		632524	K N		
ptdTomato-C1		632533	K N		

製品名	容量	製品コード	選択マーカー	価格(税別)
<b>プロモーターレス蛍光タンパク質ベクター</b> 哺乳類細胞用 プロモーターなし				
pDsRed2-1	各 20 µg	632405	K N	各 ¥126,000
pDsRed-Express2-1		632536	K N	
pAcGFP1-1		632497	K N	各 ¥88,000
pZsGreen1-1		632473	K N	
pHcRed1-1		632411	K N	
pmCherry-1		632525	K N	

製品名	容量	製品コード	選択マーカー	価格(税別)
<b>プロモーターレス不安定化蛍光タンパク質ベクター</b> 哺乳類細胞用 プロモーターなし				
pZsGreen1-DR	各 20 µg	632428	K N	¥88,000
pDsRed-Express-DR		632423	K N	¥126,000
pHcRed1-DR		632422	K N	¥88,000

製品名	容量	製品コード	選択マーカー	価格(税別)
<b>蛍光タイマーベクター</b>				
pTimer(細菌用、lacプロモーター)	各 20 µg	632402	A -	各 ¥88,000
pTimer-1(哺乳類細胞用、プロモーターなし)		632403	K N	

営利施設ユーザー様用のライセンスプログラムをご用意しております。ライセンスの詳細についてはタカラバイオ株式会社営業部(Tel: 077-543-7231)までお問い合わせください。  
 ☞ご購入に際してはライセンス確認書が必要となります。☞営利施設の場合、ご購入前にライセンス(有償)を取得する必要があります。  
 ・本パンフレットで紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。  
 ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販、譲渡、再販、譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。・本パンフレット記載の価格は2012年3月1日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。  
 ・本パンフレットに記載されている商品名等は、特に記載はなくても各社の商標、または登録商標です。・本パンフレットの内容の一部または全部を無断で転載あるいは複製することはご遠慮ください。

製品名	容量	製品コード	選択マーカー	価格(税別)
<b>プロテアソームセンサーベクター</b> 哺乳類細胞用 CMV IE プロモーター				
Proteasome Sensor	20 µg	632425	K N	¥88,000
<b>プロテアソーム活性測定用細胞株</b>				
HEK 293 ZsGreen Proteasome Sensor Cell Line	1 vial	631535	- -	¥218,000
<b>細胞内局在化ベクター</b> 哺乳類細胞用 CMV IE プロモーター				
pAcGFP1-Actin	各 20 µg	632453	K N	¥88,000
pDsRed-Monomer-Actin		632479	K N	¥126,000
pAcGFP1-Endo		632490	K N	¥88,000
pDsRed2-ER		632409	K N	¥126,000
pAcGFP1-F		632511	K N	各 ¥88,000
pAcGFP1-F Hyg		632510	A H	
pDsRed-Monomer-F		632493	K N	各 ¥126,000
pDsRed-Monomer-F Hyg		632514	A H	
pAcGFP1-Golgi		632464	K N	¥88,000
pDsRed-Monomer-Golgi		632480	K N	¥126,000
pAcGFP1-Mem		632491	K N	各 ¥88,000
pAcGFP1-Mem Hyg		632509	A H	
pDsRed-Monomer-Mem		632512	K N	各 ¥126,000
pDsRed-Monomer-Mem Hyg		632513	A H	
pAcGFP1-Mito		632432	K N	¥88,000
pDsRed2-Mito	632421	K N	¥126,000	
pHcRed1-Mito	632434	K N	各 ¥88,000	
pAcGFP1-Nuc	632431	K N		
pIRES2-AcGFP1-Nuc	632515	K N	各 ¥126,000	
pDsRed2-Nuc	632408	K N		
pHcRed1-Nuc	632433	K N		
pDsRed2-Peroxi	632418	K N		
pAcGFP1-Tubulin	632488	K N		

製品名	容量	製品コード	選択マーカー	価格(税別)
<b>蛍光タンパク質ベースベクター (遺伝子供給源としても利用可能)</b> 細菌用 lac プロモーター				
pAcGFP1	各 20 µg	632468	A -	各 ¥88,000
pZsGreen*		632446	A -	
pZsYellow*		632443	A -	
pAmCyan*		632440	A -	各 ¥126,000
pDsRed2		632404	A -	
pDsRed-Express2		632535	A -	
pDsRed-Monomer		632467	A -	各 ¥88,000
pAsRed2		632451	A -	
pHcRed1		632410	A -	
pmBanana		632528	A -	
pmCherry	632522	A -	各 ¥112,000	
pmOrange	632529	A -		
pmPlum	632527	A -		
pmRaspberry	632526	A -		
pmStrawberry	632530	A -		
ptdTomato	632531	A -		

製品名	容量	製品コード	選択マーカー	価格(税別)
<b>pGFPバリエーションベクター</b> 細菌用 lac プロモーター				
pGFP*	各 20 µg	632370	A -	各 ¥88,000
pGFPuv*		632312	A -	

製品名	容量	製品コード	選択マーカー	価格(税別)
<b>IRES蛍光タンパク質発現ベクター</b> 哺乳類細胞用 CMV IE プロモーター				
pIRES2-AcGFP1	各 20 µg	632435	K N	各 ¥88,000
pIRES2-ZsGreen1		632478	K N	
pIRES2-DsRed2		632420	K N	各 ¥126,000
pIRES2 DsRed-Express2		632540	K N	

販売元 製造元  
**タカラバイオ株式会社** 

東日本販売課 TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282  
 西日本販売課 TEL 077-543-7297 FAX 077-543-7293

TaKaRa テクニカルサポートライン  
 製品の技術的なご質問に専門の係がお応えします。  
 TEL 077-543-6116 FAX 077-543-1977

クロンテックウェブサイト <http://clontech.takara-bio.co.jp>  
 タカラバイオウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

取扱店