

QS S Assist **KINASE** _ADP-Glo™ Kit

測定法の概要

本アッセイ系は、**KINASE** による基質へのリン酸転移反応を ATP の消費を指標に Luminescent ADP Detection Assay (ADP-Glo™) 法で検出するものです。本キットにはリン酸化反応に必要なアッセイバッファー、酵素希釈バッファー、酵素、基質、および検出試薬に添加する MgCl₂ 溶液が添付されています。同封された試薬類の他に 384 Well Black Plate (CORNING, #3573 を推奨します)、ADP-Glo™ Kinase Assay (Promega, No. V9101 など) をお客様でご用意していただく必要があります。また、測定には Luminescence の測定が可能な 384 well plate 対応のマイクロプレートリーダーが必要です。同封した酵素など冷凍保存の試薬の凍結融解による繰り返し使用はできる限り避けて下さい。

Kit 内容 (400 dpt x 1 set)

試薬名	量	保存条件
10 x アッセイバッファー	2.5 mL x 1	-80°C
10 x 酵素希釈バッファー	1.4 mL x 1	-80°C
KINASE *	13 µL x 1	-80°C
基質溶液	2.6 mL x 1	-80°C
1 M MgCl ₂	250 µL x 1	-80°C

* 蛋白質濃度 **100** µg/mL

試薬調製

アッセイバッファー

10 x アッセイバッファーを精製水 (MilliQ 水を推奨します) で 10 倍希釈して、アッセイバッファーとする。調製後のアッセイバッファーは室温で保存できますが、調製当日に使い切ってください。解凍後の 10 x アッセイバッファーの残りは、繰り返しの凍結融解を避けるため適当な量毎に分注して -80°C で保存して下さい。

酵素希釈バッファー

10 x 酵素希釈バッファーを精製水 (MilliQ 水を推奨します) で 10 倍希釈して、酵素希釈バッファーとする。調製後の酵素希釈バッファーは室温で保存できますが、調製当日に使い切ってください。解凍後の 10 x 酵素希釈バッファーの残りは、繰り返しの凍結融解を避けるため適当な量毎に分注して -80°C で保存して下さい。

基質溶液

(脂質成分を含む製品では、本手順はデータの精度に大きく影響します。本手順の記載は特に厳守ください)

添付の基質溶液は希釈不要です。融解し室温に戻した後、使用直前に十分に懸濁してください(5 分間の超音波処理を推奨いたします)。解凍後の基質溶液の残りは、繰り返しの凍結融解を避けるため適当な量毎に分注して-80°C で保存して下さい。

酵素溶液

KINASE を酵素希釈バッファーで適切な倍率に希釈して酵素溶液とする。調製後の酵素溶液は氷冷下で保存し、使用直前に室温に戻して下さい。

ご用意していただく器具・試薬

384 Well Black Plate (Assay Plate)

384 Well Low Flange Black Flat Bottom Polystyrene (Corning #3573)を推奨します。

Promega ADP-Glo™ 検出試薬キット製品においては solid white, multiwell plate の使用を推奨しておりますが、測定機器によっては隣接するウェル間のクロストークの影響を受ける可能性があります。

Microplate Lids

Polystyrene Universal Microplate Lid without Corner Notch, Sterile (Corning #3098)

アッセイプレート中の反応液蒸発防止にご利用いただけます。

Plate shaker

アッセイプレートへの各試薬添加後は、十分に攪拌して反応を開始してください。

化合物溶液

適当な濃度の被験物質ストック溶液を DMSO で調製する。濃度は測定濃度の 100 倍の濃度になるようにする。これをアッセイバッファーで 25 倍に希釈し、化合物溶液とする。化合物を添加しないウェル用に溶媒(4% DMSO/アッセイバッファー)も準備する。

ADP-Glo™ 検出試薬キット

ADP-Glo™ Kinase Assay (Promega, No. V9102 の場合、本キット 2000dps 分のアッセイが可能です。)

ATP 溶液

ADP-Glo™ 検出試薬キット付属の Ultra Pure ATP, 10mM を融解し、室温に戻す。アッセイバッファーで適切な濃度に希釈し、ATP 溶液とする。

ADP-Glo™ Reagent/Mg の調製

ADP-Glo™ 検出試薬キット付属の ADP-Glo™ Reagent を融解し、9.9 mL あたり 100 µL の 1M MgCl₂ を添加する。調製後の ADP-Glo™ Reagent/Mg 溶液の残りは、繰り返しの凍結融解を避けるため適当な量毎に分注して-20°C で保存して下さい。

Kinase Detection Reagent の調製

ADP-Glo™ 検出試薬キット製品の使用説明書に従い、付属の Kinase Detection Buffer と Kinase Detection Substrate を混ぜて緩やかに懸濁して均一な溶液を調製する。Kinase Detection Buffer の添加量は Kinase Detection Substrate の vial スケールによって異なりますので、ADP-Glo™ 検出試薬キット製品の使用説明書をご参照ください。調製時に適当な量毎に分注して-20°C で保存し、必要量を融解してご使用ください(ご使用にあたり数回の凍結融解は可能です)。

ADP 産生量算出用検量線の作成

再現性良い高精度のデータを得るために、阻害率の算出には Luminescence 測定値から導いた ADP 産生量値を用いることをお勧めします。Luminescence 測定値から ADP 産生量を求めるには、ADP-Glo™ 検出試薬キット付属の Ultra Pure ATP, 10mM と ADP, 10mM を使用して、ADP 産生量に応じた Luminescence の検量線を作成する必要があります。

(手順)

- (1) 各試薬をアッセイバッファーで 100 µM となるようにそれぞれ希釈し、次に表に示す混合率となるように両者を混合して、検量線作成用の ATP/ADP 混合溶液サンプルを調製ください。

100 µM ADP	100	80	60	40	20	10	5	4	3	2	1	0	(µL)
100 µM ATP	0	20	40	60	80	90	95	96	97	98	99	100	(µL)
%ADP	100	80	60	40	20	10	5	4	3	2	1	0	

- (2) 各混合モル比の溶液サンプルを、384 Well Black Plate に 1 ウェル当たり 20 µL 添加し、リン酸化反応に興じたサンプルウェルと同様にその後の検出反応 (ADP-Glo™ Reagent/Mg 溶液の添加 + 反応 40 分、Kinase Detection Reagent の添加 + 反応 40 分) を実施ください。
- (3) 各検量線作成用サンプルの ATP/ADP 混合率(%)とその Luminescence シグナルの測定値との相関直線を検量線とし、各試験サンプルのリン酸化反応における ADP 産生量を求めて頂けます。

各反応液の構成例

反応液	化合物溶液 (μL)	溶媒 (μL)	ATP 溶液 (μL)	基質溶液 (μL)	酵素溶液 (μL)	酵素希釈バッファー (μL)
A	—	5	5	5	—	5
B	—	5	5	5	5	—
C	5	—	5	5	5	—

A: 陰性コントロール, B: 陽性コントロール, C: 試験サンプル

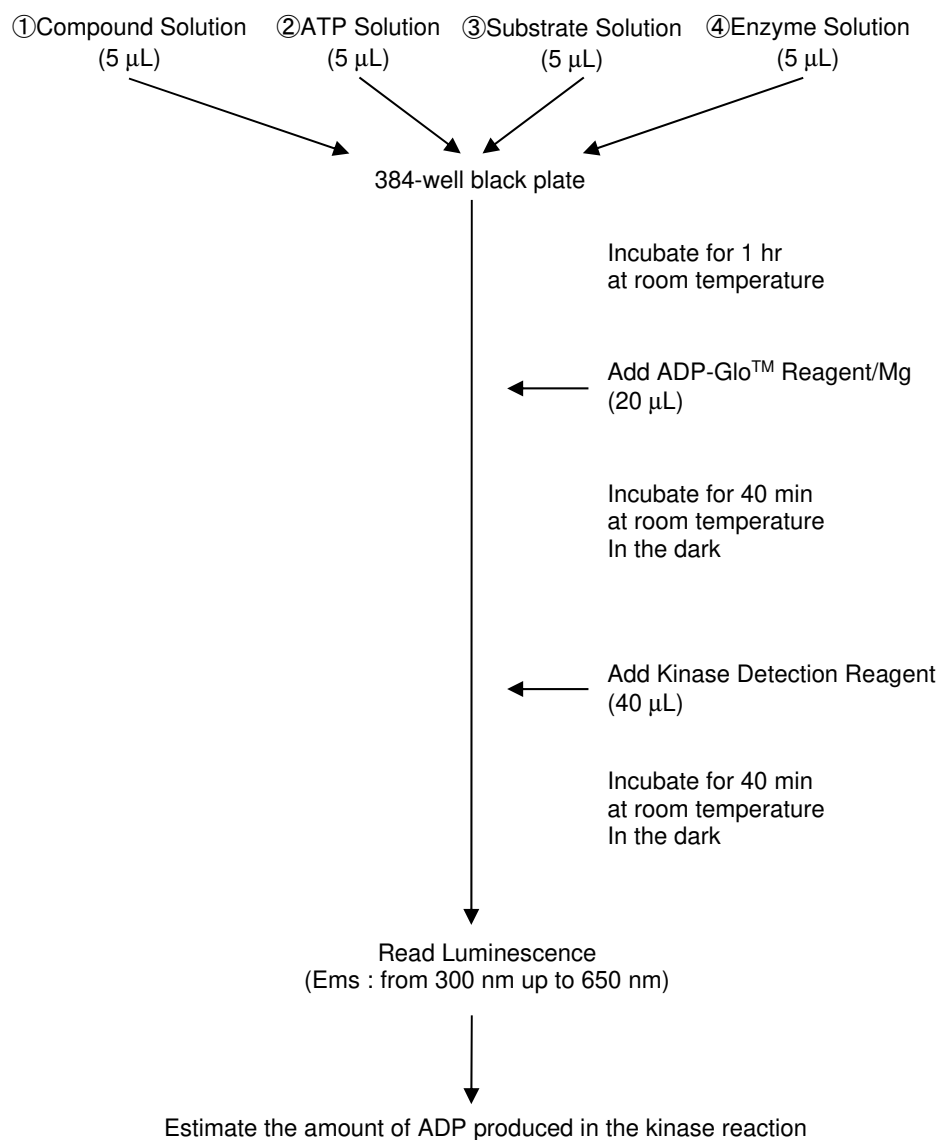
被験物質の阻害率(%)の算出

$$\text{阻害率}(\%) = (1 - (C - A) / (B - A)) \times 100$$

アッセイバッファー組成 (50 mM MOPS, 1 mM DTT, pH7.2)

その他成分 (基質濃度: 250 nM, ATP 濃度: 50 μM , 金属イオン濃度: 10 mM)

操作手順の流れ図



操作手順

1. 384 well black plate (Corning, 3573 を推奨します)の所定のウェルに化合物溶液 5 μ L、ATP 溶液を 5 μ L、基質溶液を 5 μ L ずつ添加し、さらに酵素溶液もしくは酵素希釈バッファー5 μ L を添加してリン酸化反応を開始する。なお、反応コントロールとして使用するウェルには DMSO をアッセイバッファーで 25 倍に希釈した溶媒を化合物溶液の代わりに添加する。
2. 室温にて1時間反応させる。
3. 検量線作成用 ATP/ADP 混合溶液サンプルを調製し、所定のウェルに 20 μ L ずつ添加する。

4. 各ウェルに 20 μ L の ADP-GloTM Reagent/Mg 溶液を添加する。
5. 室温・遮光条件下で 40 分間以上反応させる(2 時間以内であれば安定的なシグナルが得られます)。
6. 各ウェルに 40 μ L の Kinase Detection Reagent を添加する。
7. 室温・遮光条件下で 40 分間以上反応させる(2 時間以内であれば安定的なシグナルが得られます)。
8. プレートリーダーで Luminescence シグナルを測定する。
9. 検量線を作成し、Luminescence 測定値から ADP 産生量を求める。
10. 酵素溶液を添加した反応陽性コントロールウェルを 0%阻害、酵素溶液の代わりに酵素希釈バッファーを添加した反応陰性コントロールウェルを 100%阻害とし、それらの ADP 産生量値から化合物溶液添加ウェルの阻害率を計算する。

測定条件 (2104 EnVision D, Revvity)

Parameter	Setting
Mirror	Luminescence
Emission filter	Luminescence 700
Measurement height	6 mm
Measurement time	0.25 s

結果

本アッセイキットを用いて対照化合物の **KINASE** に対する阻害を検討した結果を以下に示します。

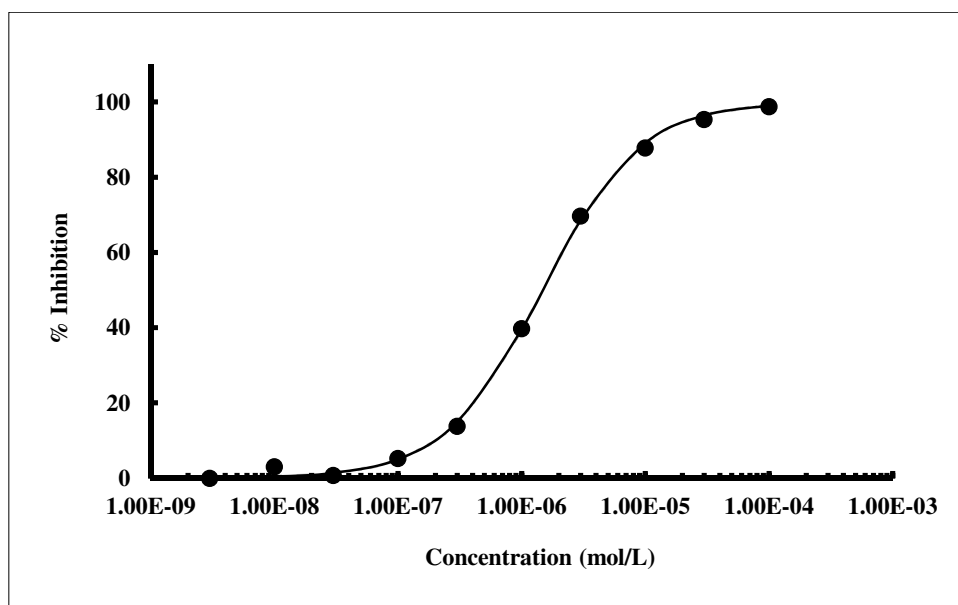


図 1 対照化合物の **KINASE** に対する阻害実験の阻害曲線