

QS S Assist **STK**_ELISA Kit

測定法の概要

本アッセイ系はタンパク質基質/ペプチド基質に対する **STK** のリン酸化を ELISA 法で検出するもので、リン酸化反応に必要なアッセイバッファー、酵素、基質とリン酸化セリン/スレオニンを検出するための一次抗体、HRP 標識二次抗体が添付されています。同封された試薬類の他に **ストレプトアビジン** プレート、キナーゼ反応停止液、ウォッシュバッファー、ブロッキングバッファー、発色試薬である TMB 及び呈色反応停止液である 0.1 M 硫酸を用意していただく必要があります。化合物の希釈には DMSO が必要です。また、測定には 450nm 及び 570 nm (あるいは 540 nm) の吸光度の測定が可能なマイクロプレートリーダーが必要です。同封した酵素、基質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 (500 dpt)

試薬名	量	保存条件
10 x アッセイバッファー	10 mL	-80°C
500 x STK *	30 µL	-80°C
5 x ATP/基質/Metal 溶液	1500 µL	-80°C
1000 x 一次抗体	70 µL	-20°C
2000 x HRP 標識二次抗体	35 µL	4°C、遮光

* 蛋白質濃度 200ug/mL

ご用意していただく器具・試薬

キナーゼ反应用プレート

ポリプロピレン製の 96 ウェルプレートをご使用下さい。

キナーゼ種によりどちらのプレートを用いるかが異なります。
ご不明な場合はお問い合わせください。

ELISA プレート

ストレプトアビジン 96 穴プレート (Nunc, 436014/PerkinElmer, 4009-0010)。

キナーゼ反応停止溶液

40 mM EDTA (pH 7.5)。プレート 1 枚につき 12 mL 程度必要です。調製後のキナーゼ反応停止溶液は室温で保存できます。

ウォッシュバッファー

50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.02% Tween 20。プレート 1 枚につき 300 mL 程度必要です。

ELISA 用 BSA

BSA (Sigma, A-7030)を10%の濃度になるようにウォッシュバッファーに溶解させ、100倍希釈で用いる。プレート1枚につき400 μ L程度必要です。調製後の溶液は1 mL程度に小分けして-80°Cで保存し、解凍してご使用下さい。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。

発色試薬

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB, MOSS, TMBE-1000)。プレート1枚につき10 mL程度必要です。

呈色反応停止試薬

0.1 M 硫酸(和光純薬、191-05445)。プレート1枚につき10 mL程度必要です。

試薬調製 (Plate 1枚分)

アッセイバッファー

10 x アッセイバッファーを解凍して1.5 mL取り、精製水(MilliQ 水を推奨します)を13.5 mL添加して、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。

化合物溶液

適当な濃度のストック溶液を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。

ATP/基質/Metal 溶液

5 x ATP/基質/Metal 溶液を解凍して250 μ L取り、アッセイバッファー1 mLに添加してATP/基質/Metal 溶液とする。調製後のATP/基質/Metal 溶液は氷冷下で保存し、使用直前に室温に戻して下さい。

酵素溶液

ご使用前にスピンドウンして下さい。500 x STKを解凍して5 μ Lを取り、アッセイバッファーを2.495 mL添加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。

ブロッキングバッファー

ウォッシュバッファーに10% BSAを100倍希釈になるように添加し、ブロッキングバッファー

とする。調製後のブロッキングバッファーは使用まで室温で保存できます。プレート 1 枚につき 40 mL 程度必要です。

一次抗体溶液

ご使用前にスピンドウンして下さい。1000 x 一次抗体 12 μ L をブロッキングバッファー12 mL に添加し、検出抗体溶液とする。調製後の検出抗体溶液は使用まで室温で保存できます。

HRP 標識二次抗体溶液

使用前にスピンドウンして下さい。2000 x HRP 標識二次抗体 6 μ L をブロッキングバッファー12 mL に添加し、検出抗体溶液とする。調製後の検出抗体溶液は使用まで室温で保存できます。

キナーゼ反応に使用する試薬の調製法を以下の表にまとめました。

試薬名	調製 (Plate 1 枚分)
アッセイバッファー	10 x アッセイバッファー, 1.5 mL + 精製水, 13.5 mL
酵素溶液	500 x STK, 5 μ L + アッセイバッファー, 2.495 mL
ATP/基質/Metal 溶液	5 x ATP/基質/Metal, 250 μ L + アッセイバッファー, 1 mL

各反応液の構成例

反応液	被験物質溶液 (μ L)	溶媒 (μ L)	ATP/基質/Metal 溶液 (μ L)	酵素溶液 (μ L)	アッセイバッファー (μ L)
A	—	10	10	—	20
B	—	10	10	20	—
C	10	—	10	20	—

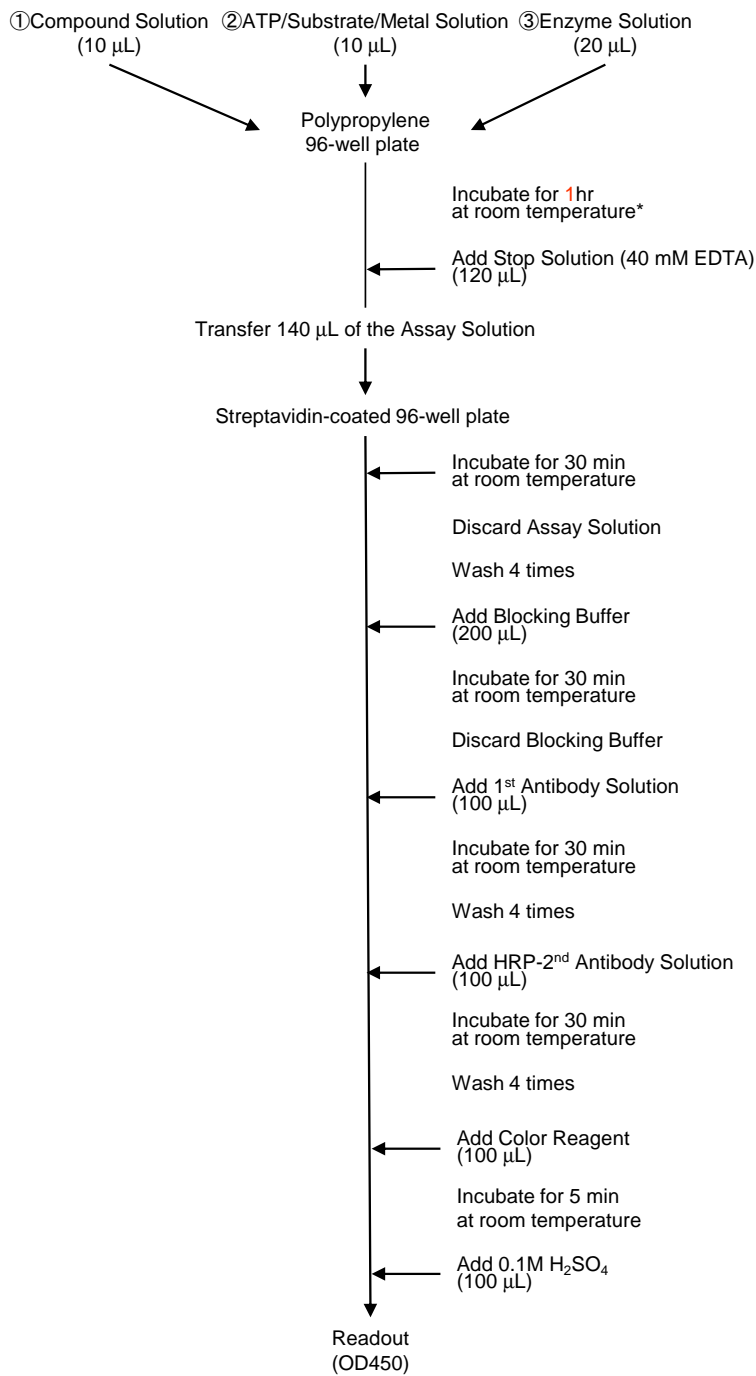
被験物質の阻害率(%)の算出 ; 阻害率(%) = $(1 - (C - A) / (B - A)) \times 100$

反応時溶液組成

15 mM Tris-HCl(pH7.5), 0.01% Tween 20, 2 mM DTT

基質濃度: 180 nM, ATP 濃度: 2 μ M, 金属: 5 mM Mg

操作手順の流れ図



*Depend on Enzyme

操作手順

1. キナーゼ反应用プレート の所定のウェルに化合物溶液を 10 μL 、ATP/基質/Metal 溶液を 10 μL 添加し、さらに酵素溶液もしくはアッセイバッファー 20 μL を添加して反応を開始し、室温にて 1 時間反応させる。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. キナーゼ反応停止溶液を各ウェルに 120 μL 添加し、反応を停止する。キナーゼ反応停止溶液は使用前に室温に戻しておく。
3. 2. の反応後溶液 140 μL を ELISA プレートに移し、室温にて 30 分間静置する。
4. ウェル内の溶液を捨て、直ちにウェルあたり 250 μL のウォッシュバッファーで 4 回洗浄する。洗浄後のプレートは、ペーパータオルなどの上でタッピングし、残存する溶液をできる限り除く。
5. 各ウェルにブロッキングバッファーを 200 μL 添加し、室温にて 30 分間静置する。
6. ウェル内の溶液を捨て、各ウェルに一次抗体溶液を 100 μL 添加し、室温にて 30 分間静置する。
7. ウェル内の溶液を捨て、直ちにウェルあたり 250 μL のウォッシュバッファーで 4 回洗浄する。洗浄後のプレートは、ペーパータオルなどの上でタッピングし、残存する溶液をできる限り除く。
8. 各ウェルに HRP 標識二次抗体溶液を 100 μL 添加し、室温にて 30 分間静置する。
9. ウェル内の溶液を捨て、直ちにウェルあたり 250 μL のウォッシュバッファーで 4 回洗浄する。洗浄後のプレートは、ペーパータオルなどの上でタッピングし、残存する溶液をできる限り除く。
10. 各ウェルに発色試薬を 100 μL 添加する。発色試薬は使用前に室温に戻しておく。
11. 室温にて正確に 5 分間反応させた後、各ウェルに呈色反応停止試薬を 100 μL 添加して反応を止める。
12. プレートリーダーにて 450 nm の吸光度を測定する。
13. 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アッセイ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、それらの吸光度から化合物溶液添加ウェルの阻害率を計算する。

結果

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

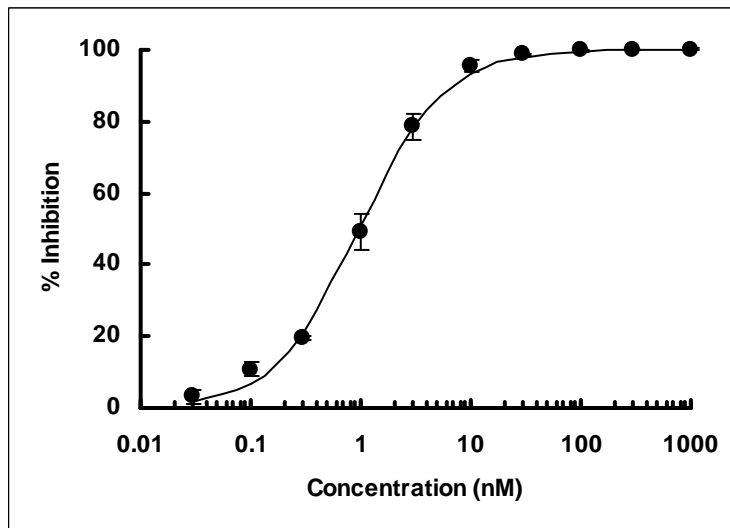


図 1 対照化合物の STK に対する阻害実験の阻害曲線