

QS S Assist **STK**_FP Kit

測定法の概要

本アッセイ系は配列中にセリン残基を含む FITC 標識ペプチド基質に対する **STK** のリン酸化を IMAP 法で検出するものです。本キットには IMAP Binding Buffer と IMAP Binding Reagent は添付していませんので、必要量ご用意下さい (IMAP™ Screening Express Kit (Progressive Binding System), R8127, Molecular Devices Corporation を推奨します)。測定には Excitation; 485 nm、Emission; 530nm の蛍光偏光度の測定が可能な 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 (800 dpt)

試薬名	量	保存条件
10 x アッセイバッファー	5 mL	-80°C
150 x STK	80 µL	-80°C
5×ATP/基質/Metal 溶液	1 mL	-80°C (遮光)

試薬調製 400dpt

アッセイバッファー

10 x アッセイバッファーの 2mL 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。

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 溶液をアッセイバッファーで 5 倍希釈して ATP/基質/Metal 溶液とする。調製後の ATP/基質/Metal 溶液は遮光して使用まで室温で保存できます。

酵素溶液

150 x STK をアッセイバッファーで 150 倍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。

調製法を以下の表にまとめました。

dpt	試薬名	調製
400	アッセイバッファー	10 x アッセイバッファー, 2 mL + 精製水, 18 mL
	ATP/基質/Metal 溶液	5 x ATP/基質/Metal, 0.5 mL + アッセイバッファー, 2 mL
	酵素溶液	150 x STK, 30 µL + アッセイバッファー, 4.47 mL

ご用意していただく試薬

IMAP™ Screening Express Kit (Progressive Binding System), R8127, Molecular Devices Corporation

検出試薬の調製

5 x IMAP Binding Buffer A (R7282)および 5 x IMAP Binding Buffer B (R7283)を精製水 (MilliQ 水を推奨します)で 5 倍希釈し、以下に示す比率で混合する。この溶液に IMAP Binding Reagent (R7284) を以下に示す倍率になるように希釈して、検出試薬とする。検出溶液の調製は添加する直前(5分前程度)に行う。調製後の検出試薬は使用まで室温で保存できます。

Binding Buffer 混合比率 : Binding Buffer A: Binding Buffer B = **100 : 0**

Binding Reagent 希釈倍率 : **400 倍**

各反応液の構成例

反応液	被験物質溶液 (μL)	溶媒 (μL)	ATP/基質溶液 (μL)	酵素溶液 (μL)	アッセイバッファー (μL)
A	—	5	5	—	10
B	—	5	5	10	—
C	5	—	5	10	—

被験物質の阻害率(%)の算出

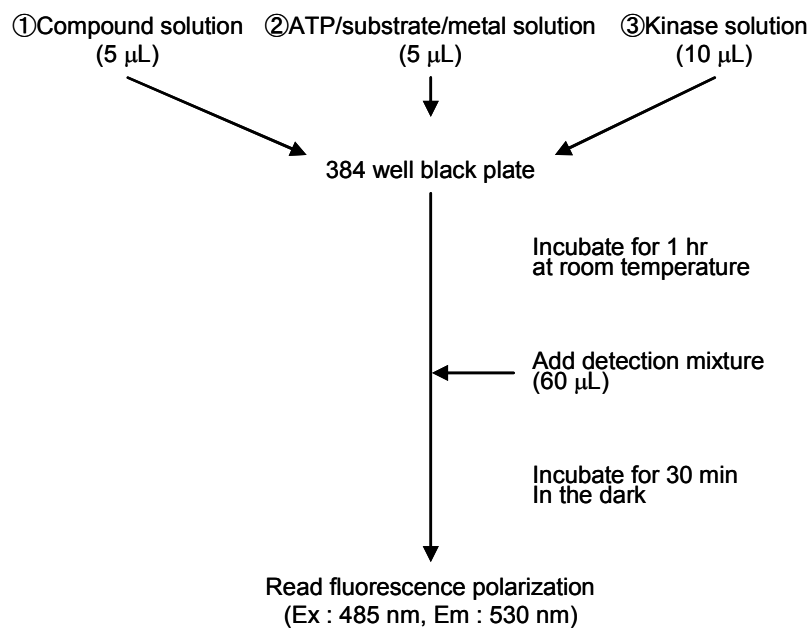
$$\text{阻害率(\%)} = (1 - (C - A) / (B - A)) \times 100$$

反応時溶液組成

20mM HEPES(pH7.4), 0.01% Tween 20, 2mM DTT

基質濃度: **100 nM**, ATP 濃度: **10 μM**, 金属: **10 mM Mg**

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/基質/Metal 溶液を 5 μ l ずつ添加し、さらに酵素溶液 10 μ l ずつを添加して反応を開始する。
2. 室温にて1時間反応させる。
3. 各ウェルに 60 μ l の検出試薬を添加する。
4. 室温にて 30 分間反応させる。
5. プレートリーダーで蛍光偏光度を測定する。

結果

本アッセイキットを用いてキナーゼ阻害薬の STK に対する阻害を検討した結果を以下に示します。

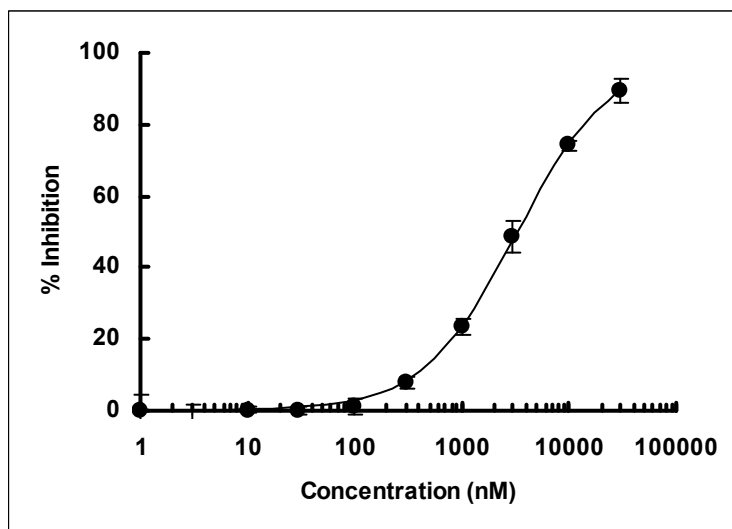


図 1 キナーゼ阻害薬の STK に対する阻害実験の阻害曲線