

QS S Assist **KINASE**_TR-FRET Kit

測定法の概要

本アッセイ系は、**KINASE** によるビオチン化ペプチド基質へのリン酸転移反応を TR-FRET 法で検出するものです。本キットにはリン酸化反応停止用の **EDTA** と、リン酸化反応検出用の Eu 標識抗リン酸化抗体及びアクセプター蛍光分子試薬は添付していませんので、必要量ご用意下さい。測定には Excitation; 320~360 nm、Emission; 665nm の TR-FRET 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。また、冷蔵試薬につきましても、速やかにご使用下さい。

Kit 内容 (800 dpt x 1 set)

試薬名	量	保存条件
10 x アッセイバッファー	5 mL x 1	-80°C
KINASE *	60 µL x 1	-80°C
5 x ATP/基質/Metal 溶液	1 mL x 1	-80°C

* 蛋白質濃度 **200** 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、調製当日に使い切して下さい。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。

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 溶液は使用まで室温で保存できます。解凍後の 5 x ATP/基質/Metal 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 をアッセイ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試薬

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。

Tris-HCl (1.0M Tris Buffer, pH7.5 Ultra Pure Grade, 1L、1st BASE、BUF-1415-1L-pH7.5)

Tween20 (Tween[®]20、Sigma-Aldrich、P7949)

EDTA (EDTA・2Na、同仁化学、345-01865)

Eu 標識抗リン酸化抗体

アクセプター蛍光分子試薬

検出溶液の調製

精製水 (MilliQ 水を推奨します) に Tris-HCl (pH 7.5)、Tween20、EDTA、Eu 標識抗リン酸化抗体及びアクセプター蛍光分子試薬を各々 15 mM、0.01 %、20 mM、**0.53 nM** 及び **33.3 nM** になるように添加して、検出溶液とします。(Eu 標識抗リン酸化抗体及びアクセプター蛍光分子試薬の濃度は参考値ですので、必要に応じて設定を変更していただいて結構です。また、抗体の lot が変わるとシグナルの値が変わる可能性がありますので、ご注意下さい。) 検出溶液の調製は添加する直前 (5 分前程度) に行ってください。調製後の検出溶液は遮光して使用まで室温で保存できます。

各反応液の構成例

反応液	化合物溶液 (μL)	溶媒 (μL)	ATP/基質/Metal 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	—

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

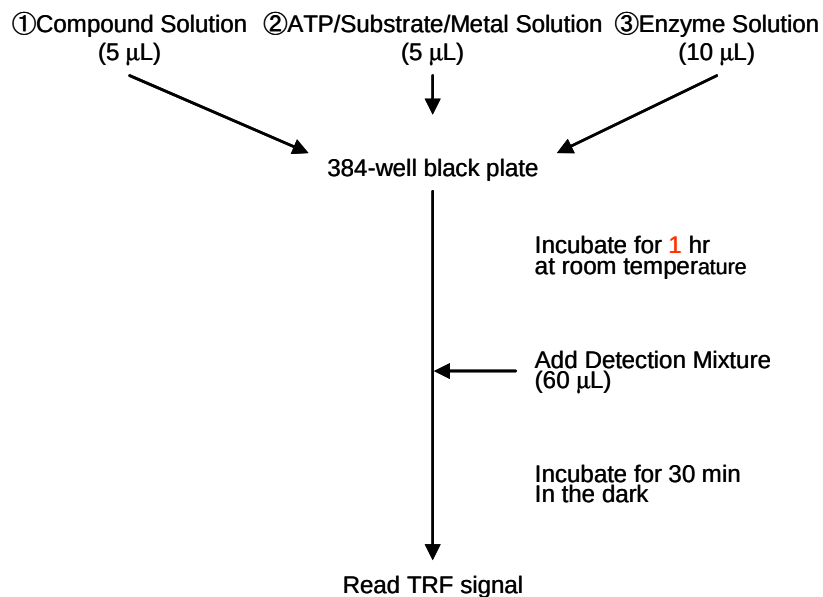
$$\text{阻害率 (\%)} = (1 - (C - A) / (B - A)) \times 100$$

リン酸化反応時溶液組成

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

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 μL 、ATP/基質/Metal 溶液を 5 μL ずつ添加し、さらに酵素溶液もしくはアッセイバッファー10 μL 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. 各ウェルに 60 μL の検出溶液を添加する。
4. 室温・遮光条件下で 30 分間反応させる。
5. プレートリーダーで TR-FRET シグナルを測定する。
6. 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 TR-FRET シグナル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 (2104EnVision D, PerkinElmer)

Parameter	Setting
Light source	Laser
Top mirror	LANCE/DELFIABias
Excitation filter	TRF 320nm
Emission filter	APC 665nm
Emission filter 2	Europium 615nm
Measurement height	7 mm
Cycle	16600
Delay	50 μ s
Number of flashes	40
Window time	400 μ 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。

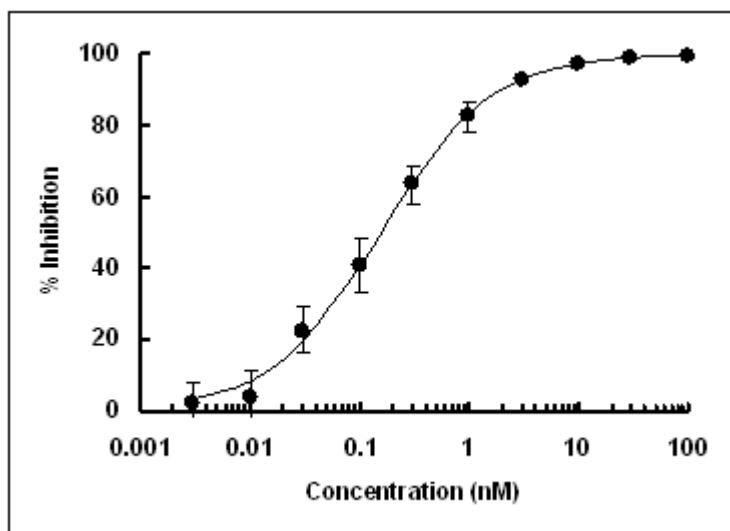


図 1 対照化合物の KINASE に対する阻害実験の阻害曲線