

LANCE FAQs

- [アプリケーション](#)
- [測定機の設定](#)
- [トラブルシューティング](#)

アプリケーション

Q. LANCE/LANCE Ultra には、ドナーおよびアクセプター蛍光物質として何が使用されていますか？

A. LANCE Ultra は、ドナーに LANCE ユーロピウムキレート、アクセプターに ULight 蛍光色素を使用しています。また LANCE には、ドナーに LANCE ユーロピウムキレート、アクセプターに SureLight™ allophycocyanin (APC)を使用しています。

LANCE/LANCE Ultra ドナー および アクセプターの蛍光物質		
ドナー/アクセプター	蛍光物質	分子量
ドナー	LANCE Eu-W1024	695 Da
ドナー	LANCE Eu-W8044	826 Da
アクセプター	LANCE ULight dye	< 800 Da
アクセプター	SureLight APC dye	~102,000 Da (102 kDa)

Q. LANCE Eu-W1024 と LANCE Eu-W8044 の違いは何ですか？

A.LANCE Eu-W1024 キレートは、殆どのアプリケーションで優先的に使用される LANCE キレートで、LANCE アッセイにおいて高い S/B 比が得られます。LANCE Eu-W8044 キレートは、EDTA やその他キレートを高濃度で使用する場合、また 38℃以上の高温条件を必要とするアッセイにおいてより安定なキレートです。詳細は、[こちら](#)のアプリケーションノートをご参考ください。

Q. DELFIA ユーロピウム試薬を LANCE TR-FRET に使用できますか？

A.できません。DELFIA ユーロピウムキレートは、通常蛍光を持ちません。DELFIA Enhancement 溶液(Cat#1244-104)を添加することでキレートが解離し、ランタニドを溶液中に遊離、Enhancement 溶液に含まれる新たなキレートと界面活性剤のミセルを形成して蛍光を持ちます。TR-FRET アッセイでは、結合分子からランタニドを解離し検出することはできません。LANCE アッセイでは LANCE ユーロピウムキレートをご使用ください。

測定機の設定

LANCE と LANCE Ultra アッセイには、時間分解蛍光測定が可能なマイクロプレートリーダーが必要で
 す。また、モノクロメーターでも測定は可能ですが、アッセイ感度が落ちる可能性があるため、フィルタ
 ータイプの測定機の使用を推奨しています。弊社では、フィルタータイプの測定機として、ARVO™,
 EnVision®, ViewLux™ を推奨しています。アッセイに適したフィルターが測定機に設置されているか確
 認してください。他社の測定機を使用する場合、設定やフィルターなどが LANCE TR-FRET アッセイに
 最適化されているか、各メーカーにお問い合わせください。

励起には、320nm または 340nm のフィルターをご使用ください。検出は、ドナー側のユーロピウム蛍
 光波長 615nm と、アクセプター側の蛍光波長 665nm(APC または ULight、Alexa Fluor647)の両方の
 検出をお勧めします。データとして、665nm の FRET シグナルを使用します。また、615nm シグナル
 の解析は、トラブルシューティングに利用できます。

測定機推奨設定_LANCE cAMP assay			
Parameter	ARVO	EnVision	ViewLux
Flash Energy Area	High	n/a	n/a
Flash Energy Level	150	100%	600,000
Excitation Filter	320/340	UV2 320	DUG11 (UMB,AMC)
Integrator Cap	3	n/a	n/a
Integrator Level	2x LANCE High Count 615	n/a	n/a
Emission Filter	1) 615 nm	1) 203 - Eu 615	1) 618/8 (Eu)
	2) 665 nm	2) 205 - APC 665	2) 671/8 (LANCE)
Delay Time	50 μ s	60 μ s	50 μ s
Readout speed, gain and binning	n/a	n/a	Medium, High, and 2x
Number of Flashes	n/a	100	n/a
Window	100 μ s (200 μ s)	100 μ s (200 μ s)	354 μ s
Mirror module	n/a	462 (D400/D630) or 412 (D400)	n/a
Cycle	2000 μ s	2000 μ s	n/a

測定機推奨設定_ LANCE Ultra Kinase Assay			
Parameter	ARVO	EnVision	ViewLux*
Flash Energy Area	High	n/a	n/a
Flash Energy Level	150	100%	800,000
Excitation Filter	320/340	UV 320/340	DUG11 (UMB, AMC)
Integrator Cap	2 (or 3**)	n/a	n/a
Integrator Level	2x the setting in LANCE High Count 615 label	n/a	n/a
Emission Filter	1) 615 nm	1) 203 - Eu 615	1) 618/8 (Eu)
	2) 665 nm	2) 205 - APC 665	2) 671/8 (LANCE)
Delay Time	50 μ s	90 μ s	50 μ s
Readout speed, gain and binning	n/a	n/a	medium, high, and 2x
Measurement Time	n/a	100 (200**) flashes	20 s exposure time
Window	100 μ s (200-300 μ s**)	100 μ s (200-300 μ s**)	354 μ s
Mirror module	n/a	402/412 (D400) or 452/462/662 (D400/D630)	Mirror 2 (UV dichroic)
Cycle	1000 μ s	2000 μ s	n/a

* ViewLux 設定: flat field correction, bias correction, cosmic ray detection, excitation energy compensation

**シグナルが著しく低い場合

- EnVision レーザー設定

Delay: 50 μ s (S/Bを改善したい場合は Delay:10 μ s)

Window time: 100 μ s

Time between flashes: 16600 μ s

Focus height: 6.5 mm

トラブルシューティング

LANCE <i>Ultra</i> Kinase Assays		
問題	原因	解決法
シグナルが低い	プロトコール	反応停止溶液は使用前に調製する。
		EDTA の濃度を下げる。(参考: アプリケーションノート).
	反応条件	酵素の必須コファクターを添加する。
		使用した水を確認する。高濃度の重金属陽イオンはユーロピウムイオンに作用し、蛍光を消光する。試薬の調製には、超純水グレードのものを使用する。
		リン酸ベースのバッファーを使用しない。
バックグラウンドが高い	ULight™濃度が高過ぎる	推奨の濃度(10µL 酵素反応において最終濃度 50 nM)を使用。100nM 以上の濃度はバックグラウンドシグナルが高くなる。
	測定機の設定	測定機の設定を確認。
非特異的なシグナル	反応条件	キナーゼに推奨された LANCE <i>Ultra</i> ULight 基質を使用しているか確認する。(参考: ULight 基質の選択)
		キナーゼバッファーに必須コファクターが入っているか確認する。
	ペプチド基質	MAP キナーゼパスウェイ上の多くのキナーゼはペプチドを効率的にはリン酸化しない。カスケードアッセイを行うか、タンパク質基質を使用する。