



PERKINELMER JAPAN CO., LTD

LANCE *Ultra* cAMPkit

アッセイセットアップガイド

Catalog numbers :

TRF-0262: 1,000 assay points

TRF-0263: 10,000 assay points

TRF-0264: 50,000 assay points

For Laboratory Use Only
Research Chemicals for Research Purposes Only

目次

I. ご使用になる前に.....	3
II. キット・試薬・消耗品	3
III. アッセイの原理.....	4
IV. バッファー・ストック溶液の調製	4
V. 細胞の調製.....	5
VI. cAMP 検量線の作製	6
VII. フォルスコリン用量-反応曲線/ 至適細胞数(Gs-, Gi-共役受容体)	9
VIII. Gs 共役受容体/ アゴニスト用量-反応曲線.....	13
IX. Gs 共役受容体/ アンタゴニスト用量-反応曲線.....	16
X. Gi 共役受容体/ アゴニスト用量-反応曲線.....	19
XI. Gi 共役受容体/ アンタゴニスト用量-反応曲線	22
XII. 2ステップアッセイ	25
XIII. 使用機器とセッティング	27
XIV. 推奨アッセイボリューム.....	28
XV. 注意.....	28
XVI. FAQ(よくあるご質問)	29

I. ご使用になる前に

- 1 ウェルあたりのアッセイボリュームが少ないと、蒸発する可能性がありますので、インキュベーション中は TopSeal-A (PerkinElmer, #6005185)などでマイクロプレートをシールしてください。シールは測定前に剥してください。
- キットは 2°C - 8°C にて保存してください。Eu-cAMP tracer のみ、小分けして-20°C で保存し、凍結融解は避けてください。
- キットの消費期限は、外装箱に表示されています。

II. キット・試薬・消耗品

A. キットのパッケージサイズと内容

キットには下記の試薬が付属します。

REAGENT	TRF0262 1,000 assay points*	TRF0263 10,000 assay points*	TRF0264 50,000 assay points*
cAMP standard	1 vial, 1 mL	1 vial, 1 mL	1 vial, 1 mL
Eu-cAMP tracer	1 vial, 110 µL	1 vial, 1 mL	5 vials, 1 mL each
ULight-anti-cAMP mAb	1 vial, 37 µL	1 vial, 340 µL	1 vial, 1.68 mL
cAMP Detection Buffer	1 bottle, 25 mL	1 bottle, 250 mL	4 bottles, 25 mL each
BSA Stabilizer (7.5% Solution)	1 vial, 1 mL	1 bottle, 10 mL	1 bottle, 50 mL

* 1 ポイントは、アッセイボリューム 20 µL の試薬量で使用した時の 1 ウェル分に相当します。

B. LANCE Ultra cAMP kit 以外に必要な試薬・消耗品

アッセイのセットアップに使用するバッファーや試薬の調製には、下記をお勧めします。

試薬・消耗品	メーカー	製品コード
1X HBSS	Invitrogen	14025-092
1 M HEPES	Invitrogen	15630-080
1X PBS	Invitrogen	10010-023
Forskolin	Calbiochem	344270
IBMX (3-Isobutyl-1-Methylxanthine)	Sigma	I7018
DMSO	Sigma	D2650
1N NaOH	Sigma	S2770
OptiPlate-384, white	PerkinElmer	6007290 (50 枚), 6007299 (200 枚)
ProxiPlate-384 Plus, white	PerkinElmer	6008280 (50 枚), 6008289 (200 枚)
OptiPlate-96, white	PerkinElmer	6005290 (50 枚), 6005299 (200 枚)
OptiPlate-1536, white	PerkinElmer	6004290 (50 枚), 6004299 (200 枚)
TopSeal™-A 384	PerkinElmer	6005250

III. アッセイの原理

LANCE *Ultra* cAMP は、ホモジニアスな時間分解蛍光共鳴エネルギー転移(TR-FRET)を基盤としたイムノアッセイであり、Gタンパク質共役受容体(GPCR)の調節を受け産生されるcAMPを測定します。

アッセイは、ULight標識抗cAMPモノクローナル抗体(アクセプター)に対する、ユーロピウムキレート標識cAMPトレーサー (Eu-cAMPトレーサー; ドナー)と、サンプル中のcAMPの競合的結合反応です。

抗体がEu-cAMPトレーサーと結合している場合、320あるいは340 nmの励起光によってEuキレートが励起、抗体上のULightにエネルギーが転移し、665 nmの蛍光を発します(FRET)。この時、FRETの残エネルギーは、Euキレートの615 nmの蛍光としても放出されます。

cAMP非存在下では、最大のTR-FRETシグナルが得られ(図1左)、一方で、細胞が刺激を受けcAMPが産生されると、Eu-cAMPトレーサーと抗体の結合が競合阻害され、TR-FRETシグナルが低下します(図1右)。

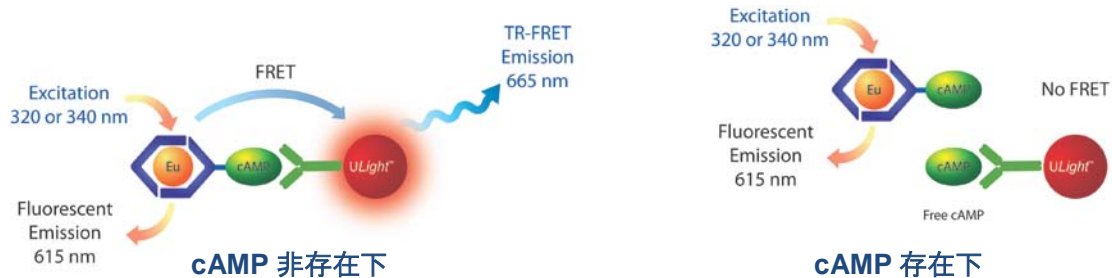


図 1. LANCE *Ultra* cAMP アッセイの原理

IV. バッファー・ストック溶液の調製

再現性を得るため、下記プロトコールに従ってバッファーやストック溶液を調製してください。

■ **IBMX (250 mM ストック溶液)**

- 50 mg の IBMX を、900 μ L の DMSO に溶解し、250 mM のストック溶液を調製します。
- 小分けし、 -20° C にて保存します。

■ **Stimulation buffer**

- 15 mL の stimulation buffer (HBSS, 5 mM HEPES, 0.5 mM IBMX, 0.1% BSA)を以下のように調製します。

試薬	ボリューム
1X HBSS	14 mL
7.5%L BSA Stabilizer	200 μ L
250 mM IBMX	30 μ L
1M HEPES	75 μ L

- 1N NaOH を用いて pH7.4 に調整し、1X HBSS にて 15 mL にメスアップします。

Notes:

- * 用時調製し、室温に保ちます。
- * Stimulation buffer は、フォルスコリン/ アゴニスト/ アンタゴニストアッセイで使用します。
- * cAMP 検量線作製時にも、0.5 mM IBMX が添加された Stimulation buffer の使用をお勧めします。

■ フォルスコリン (50 mM ストック溶液)

- 5 mg のフォルスコリンを 244 μ L の DMSO に溶解します。
- 小分けし、 -20° C にて保存します。

V. 細胞の調製

凍結細胞の調製

- 37° C のウォーターバスを用いてすばやく解凍し、チューブを上下に返して攪拌しながら、細胞を完全に解凍します。
- 4 mL の 1X HBSS を加えた 15 mL の遠沈管に移し、 $275 \times g$ にて 10 分間遠心します。
- 上清を除き、1.5 mL の 1X HBSS で細胞を再懸濁します。
- トリパンプルー染色や、生死細胞自動測定器を用いて、細胞数を計測します。(細胞の生存率は、90 % 以上に保つことをお勧めします。)
- 再度 $275 \times g$ にて 5 分間遠心し、アッセイに応じ、必要とする細胞数になるように懸濁します。

培養細胞の調製

細胞は、70-90%コンフルエントの状態でご回収してください。

- 培地を除き、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ フリーの PBS を用いて手早く細胞をリンスします。
- 5 mM EDTA を加えた PBS(その他の細胞剥離溶液も使用できます。)を加え、 37° C にて 5 分間インキュベートし、細胞を剥離します。
- $275 \times g$ にて 10 分間遠心後、上清をデカンテーションなどで除き、細胞を 1X HBSS に再懸濁します。
- トリパンプルー染色や生死細胞自動測定器を用いて、細胞数を計測します。(細胞の生存率は、90 % 以上が適しています。)
- 再度 $275 \times g$ にて 5 分間遠心し、アッセイに応じ、必要とする細胞数になるように懸濁します。

VI. cAMP 検量線の作製

検量線から感度が決められます。細胞ベースのアッセイにおける cAMP 産生量も定量可能です。

試薬の調製:

■ Stimulation buffer

- 15 mL の Stimulation buffer をセクション IV に従って調製します。

■ 4X cAMP 希釈系列. cAMP dilutions (4X)

- 50 μM cAMP ストック溶液を、 4×10^{-6} から 4×10^{-11} M の濃度幅において 0.5 log 単位で希釈し、4X cAMP 希釈系列を調製します。希釈方法を下記に記載します。

Tube	[Final] (M)	[4X] (M)	Volume of dilution	Stimulation Buffer
1	1×10^{-6}	4×10^{-6}	8 μL from 50 μM stock	92 μL
2	3×10^{-7}	1.2×10^{-6}	30 μL from 1	70 μL
3	1×10^{-7}	4×10^{-7}	30 μL from 2	60 μL
4	3×10^{-8}	1.2×10^{-7}	30 μL from 3	70 μL
5	1×10^{-8}	4×10^{-8}	30 μL from 4	60 μL
6	3×10^{-9}	1.2×10^{-8}	30 μL from 5	70 μL
7	1×10^{-9}	4×10^{-9}	30 μL from 6	60 μL
8	3×10^{-10}	1.2×10^{-9}	30 μL from 7	70 μL
9	1×10^{-10}	4×10^{-10}	30 μL from 8	60 μL
10	3×10^{-11}	1.2×10^{-10}	30 μL from 9	70 μL
11	1×10^{-11}	4×10^{-11}	30 μL from 10	60 μL
12 (ctrl)	0	0	-	70 μL

Note: 用時調製します。

■ 4X Eu-cAMP tracer 溶液

- cAMP Detection Buffer を用いて、Eu-cAMP tracer ストック溶液を 50 倍希釈し、4X Eu-cAMP tracer 溶液を調製します。
- 例: 245 μL の cAMP Detection Buffer に、5 μL の Eu-cAMP tracer を加え、穏やかに混合します。

■ 4X ULight-anti-cAMP antibody 溶液

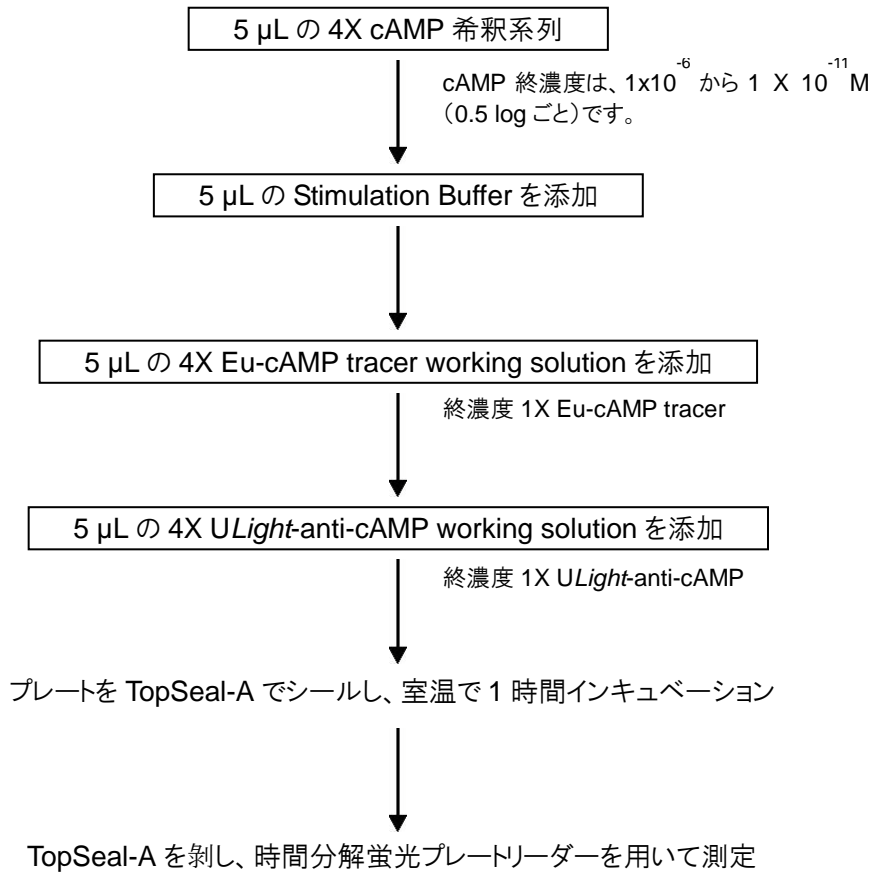
- ULight-anti-cAMP antibody ストック溶液を、cAMP Detection Buffer を用いて 150 倍希釈し、4X ULight-anti-cAMP working solution を調製します。
- 例: 745 μL の cAMP Detection Buffer に、5 μL の ULight-anti-cAMP を加え、穏やかに混合します。

Notes:

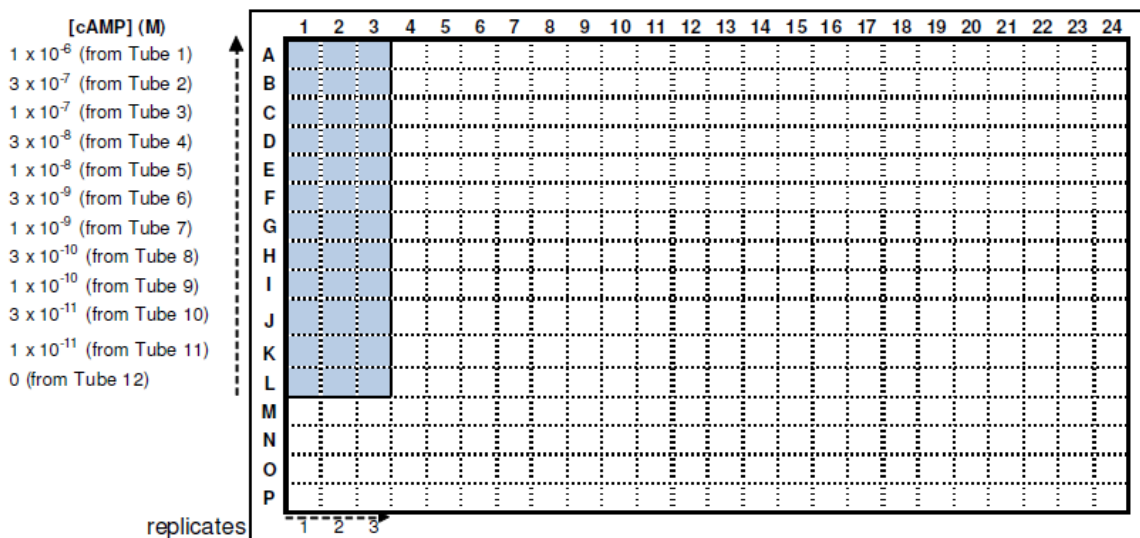
- * 調製した試薬は 4° C で 24 時間まで保存可能です。
- * 最適なアッセイパフォーマンスを得るには、Eu-cAMP tracer と ULight-anti-cAMP の希釈率を変更しないでください。

アッセイのフローチャート:

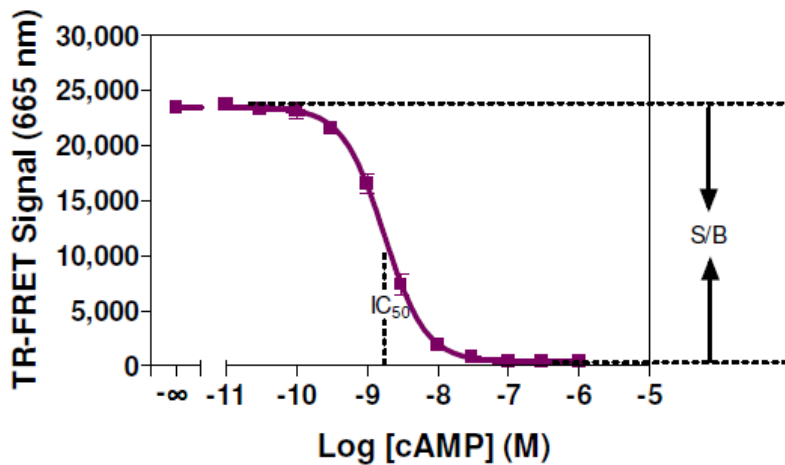
OptoPlate-384(白)を使用し、n=3 でアッセイを行います。



プレートマップ:

cAMP 検量線(EnVision[®] TRF laser オプションにて測定):

cAMP 濃度と得られた TR-FRET シグナルを、X 軸片対数グラフにプロットします。



解析結果:

EnVision を用いて測定すると、~70 の S/B (signal-to-background ratio) が得られ、ダイナミックレンジは 1.5 logs、IC₅₀ ~1.4 nM の cAMP 検量線が得られます。

VII. フォルスコリン用量-反応曲線/ 至適細胞数(Gs-, Gi-共役受容体)

フォルスコリンは、リガンドと受容体の結合を介すことなくアデニル酸シクラーゼに直接作用し、cAMP 産生を促進します。フォルスコリン 100 %効果濃度(EC_{100})において産生された cAMP 量が、その細胞が産生可能な最大 cAMP 量に相当します。このため、刺激剤にフォルスコリンを使用し、細胞ベースの cAMP アッセイにおける至適細胞数を決定します。フォルスコリン反応曲線は、至適細胞数において cAMP 検量線の直線領域内に収まり、フォルスコリン刺激時の S/ B は、cAMP 検量線の S/ B とほぼ一致します。トータルボリューム 20 μ L のアッセイ(384-well Plate)では、フォルスコリン用量-反応曲線を、細胞数 500-5,000 の幅で作製することをお勧めします。

Gs 共役受容体において、至適細胞数は、完全アゴニストを用いたアゴニスト容量-反応曲線から決定されます。Gi 共役受容体では、アデニル酸シクラーゼの cAMP 産生活性を刺激するために、 EC_{90} 濃度のフォルスコリンを細胞に添加します。

試薬の調製:

■ Stimulation buffer

- 15 mL の Stimulation buffer をセクション IV に従って調製します。

■ 2X フォルスコリン希釈系列

- 50 mM フォルスコリンストック溶液(ストック溶液の調製はセクション IV を参照)を室温にて解凍し、5 μ L を 495 μ L の stimulation buffer に加え、500 μ M フォルスコリン溶液を調製します。
- 500 μ M フォルスコリン溶液を、 2×10^{-4} から 2×10^{-9} M の濃度幅において 0.5 log 単位で希釈し、2X フォルスコリン希釈系列を調製します。希釈方法を下記に記載します。

Tube	[Final] (M)	[2X] (M)	Volume of dilution	Stimulation Buffer
1	1×10^{-4}	2×10^{-4}	160 μ L from 500 μ M	240 μ L
2	3×10^{-5}	6×10^{-5}	120 μ L from 1	280 μ L
3	1×10^{-5}	2×10^{-5}	120 μ L from 2	240 μ L
4	3×10^{-6}	6×10^{-6}	120 μ L from 3	280 μ L
5	1×10^{-6}	2×10^{-6}	120 μ L from 4	240 μ L
6	3×10^{-7}	6×10^{-7}	120 μ L from 5	280 μ L
7	1×10^{-7}	2×10^{-7}	120 μ L from 6	240 μ L
8	3×10^{-8}	6×10^{-8}	120 μ L from 7	280 μ L
9	1×10^{-8}	2×10^{-8}	120 μ L from 8	240 μ L
10	3×10^{-9}	6×10^{-9}	120 μ L from 9	280 μ L
11	1×10^{-9}	2×10^{-9}	120 μ L from 10	240 μ L
12 (ctrl)	0	0	-	280 μ L

Note: 用時調製します。

■ **4X Eu-cAMP tracer 溶液**

- ・ cAMP Detection Buffer を用いて、Eu-cAMP tracer ストック溶液を 50 倍希釈し、4X Eu-cAMP tracer 溶液を調製します。
- ・ 例: 245 μL の cAMP Detection Buffer に、5 μL の Eu-cAMP tracer を加え、穏やかに混合します。

■ **4X ULight-anti-cAMP antibody 溶液**

- ・ ULight-anti-cAMP antibody ストック溶液を、cAMP Detection Buffer を用いて 150 倍希釈し、4X ULight-anti-cAMP working solution を調製します。
- ・ 例: 745 μL の cAMP Detection Buffer に、5 μL の ULight-anti-cAMP を加え、穏やかに混合します。

Notes:

- * 調製した試薬は 4° C で 24 時間まで保存可能です。
- * 最適なアッセイパフォーマンスを得るには、Eu-cAMP tracer と ULight-anti-cAMP の希釈率を変更しないでください。

■ **細胞の希釈**

細胞を希釈する前に、セクション V 細胞の調製をご覧ください。

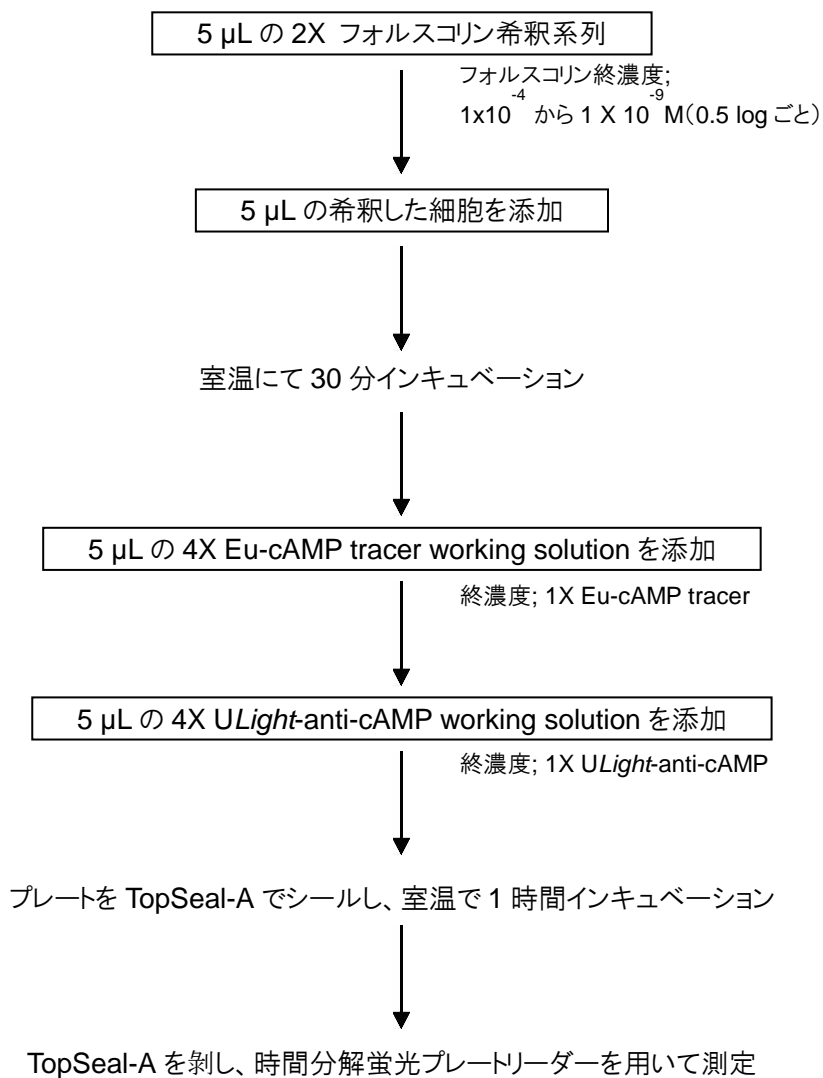
- ・ Stimulation buffer を用いて、細胞を 1,000 cells/ μL (1×10^6 cells/ mL) に希釈します。
- ・ さらに Stimulation buffer で、下表のように、600, 400, 200, 100 cells/ μL に希釈します。

Cells/ μL	Cell solution (μL)	Stimulation buffer (μL)	Cells/ well
1000	-		5,000
600	540 of 1000 cells/ μL	360	3,000
400	460 of 600 cells/ μL	230	2,000
200	300 of 400 cells/ μL	300	1,000
100	200 of 200 cells/ μL	200	500

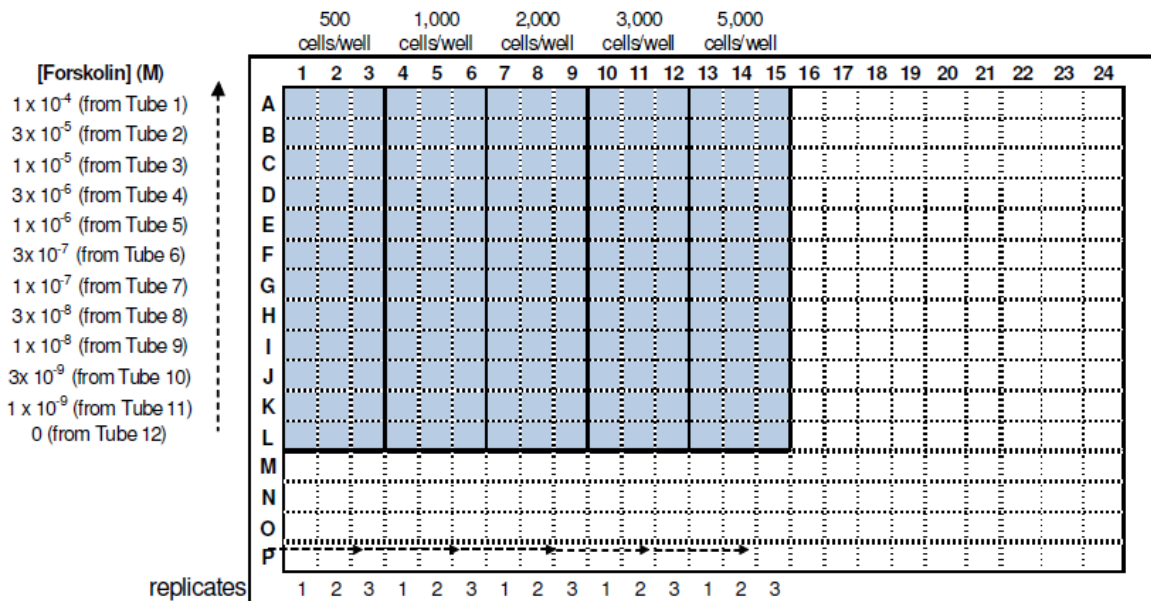
Note: 用時調製します。

アッセイのフローチャート:

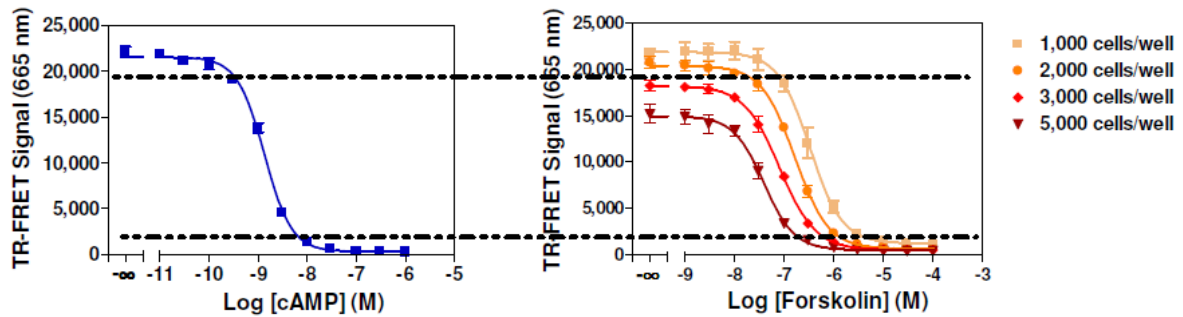
OptoPlate-384(白)を使用し、n=3 でアッセイを行います。



プレートマップ:

フォルスコリン用量-反応曲線(EnVision[®] TRF laser オプションにて測定):

フォルスコリン濃度と得られたシグナルを X 軸片対数グラフにプロットします。それぞれの細胞数におけるフォルスコリン用量-反応曲線を cAMP 検量線と比較し、アッセイウィンドウ(下図点線)と S/B が cAMP 検量線とほぼ一致する時の細胞数が、至適条件となります。



解析結果:

上記例では、cAMP 検量線のアッセイウィンドウに収まっている、細胞数 2,000 cells/ well が適当です。続いて行うアゴニスト容量-反応曲線などの実験にも、得られた 2,000 cells/ well の条件を使用します。

VIII. Gs 共役受容体/ アゴニスト用量-反応曲線

試薬の調製:

■ **Stimulation buffer**

- ・ 15 mL の Stimulation buffer をセクション IV に従って調製します。

■ **2X アゴニスト希釈系列**

- ・ Stimulation buffer を用いてアゴニストを 2X 濃度に調製します。希釈系列は、アゴニストの、予想される EC50 濃度から上下 3 log の濃度幅であることが望ましい条件です。希釈系列は、11 点調製し、アゴニスト濃度 0 も含め、12 点の希釈系列を 0.5 log 単位で調製します。

■ **4X Eu-cAMP tracer 溶液**

- ・ cAMP Detection Buffer を用いて、Eu-cAMP tracer ストック溶液を 50 倍希釈し、4X Eu-cAMP tracer 溶液を調製します。
- ・ 例: 245 μ L の cAMP Detection Buffer に、5 μ L の Eu-cAMP tracer を加え、穏やかに混合します。

■ **4X ULight-anti-cAMP antibody 溶液**

- ・ ULight-anti-cAMP antibody ストック溶液を、cAMP Detection Buffer を用いて 150 倍希釈し、4X ULight-anti-cAMP working solution を調製します。
- ・ 例: 745 μ L の cAMP Detection Buffer に、5 μ L の ULight-anti-cAMP を加え、穏やかに混合します。

Notes:

- * 調製した試薬は 4° C で 24 時間まで保存可能です。
- * 最適なアッセイパフォーマンスを得るには、Eu-cAMP tracer と ULight-anti-cAMP の希釈率を変更しないでください。

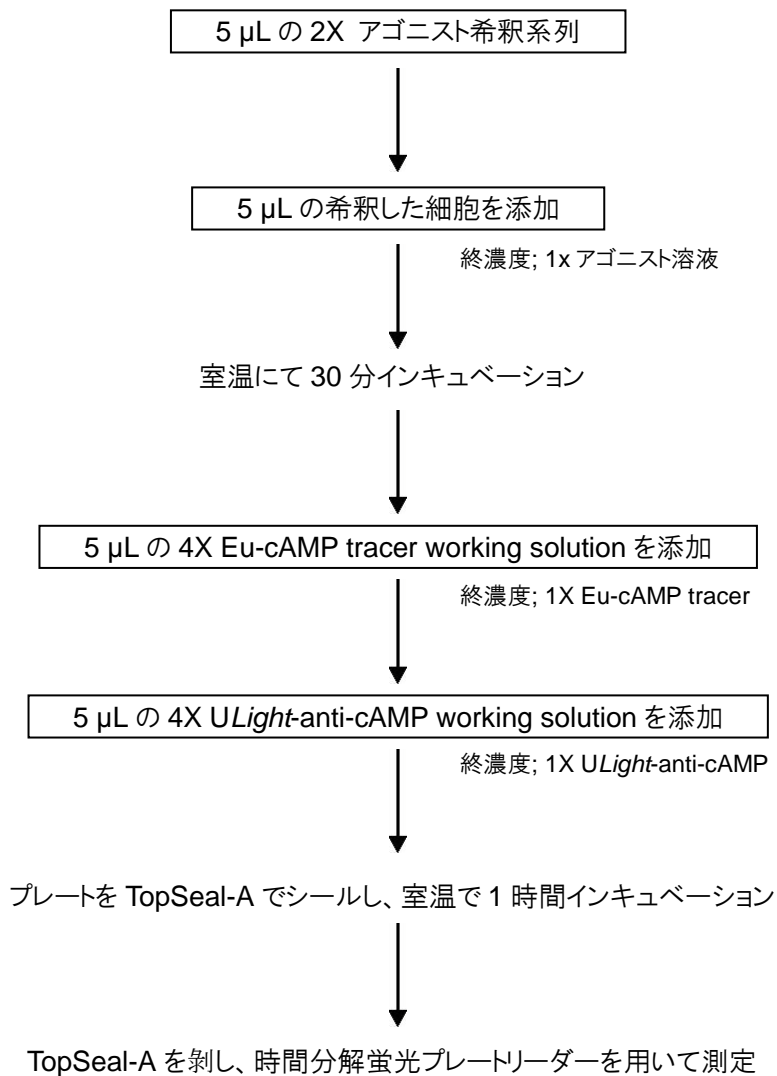
■ **細胞の希釈 Cell dilution**

細胞を希釈する前に、セクション V 細胞の調製をご覧ください。

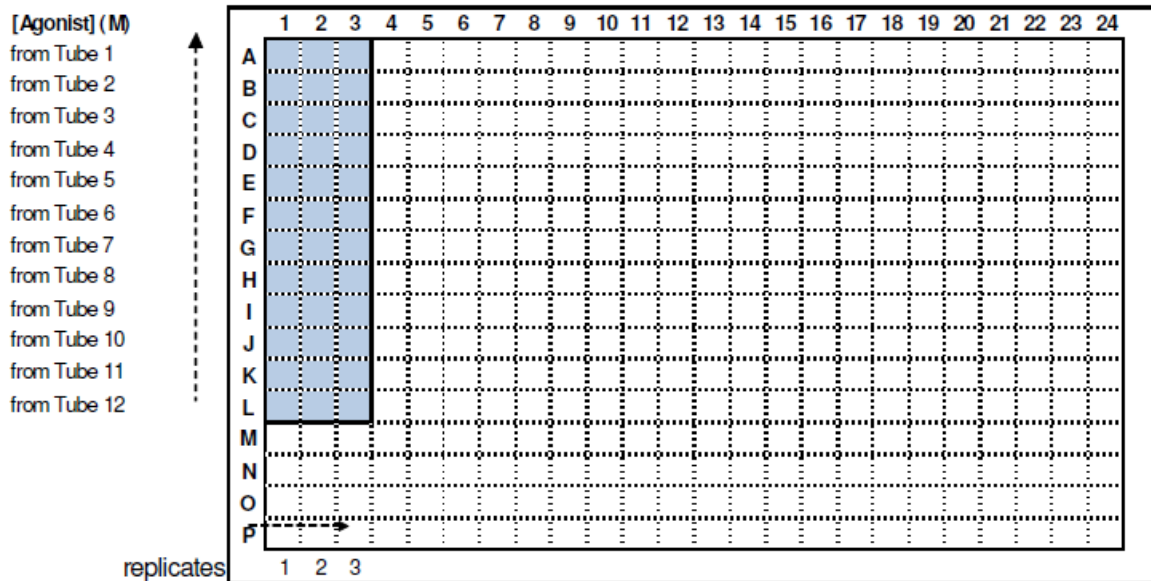
- ・ Stimulation buffer を用いて、細胞を調製します(例えば 200 cells/ μ L)。

アッセイのフローチャート:

OptoPlate-384(白)を使用し、n=3 でアッセイを行います。

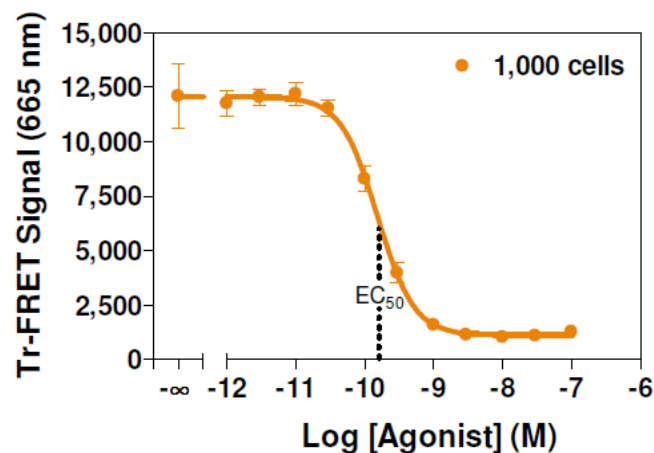


プレートマップ:



Gs アゴニスト用量-反応曲線 (EnVision[®] TRF laser オプションにて測定):

アゴニスト濃度と、得られた TR-FRET シグナルを X 軸片対数グラフにプロットします。



解析結果:

アゴニストの EC_{50} は、最大シグナルの 50 % のシグナルを与える濃度、すなわちアゴニスト用量-反応曲線の間接点から得られます。cAMP 産生量は、得られたシグナルを、cAMP 検量線にプロットして求めます。これによって、cAMP 産生におけるアゴニストの EC_{50} を決定することができます。

IX. Gs 共役受容体/ アンタゴニスト用量-反応曲線

試薬の調製:

■ **Stimulation buffer**

- ・ 15 mL の Stimulation buffer をセクション IV に従って調製します。

■ **4X アゴニスト溶液**

- ・ Stimulation buffer を用いてアゴニストを 4X 濃度に調製します。アゴニスト EC₉₀ にてアッセイを行うことをお勧めします。

■ **4X アンタゴニスト溶液**

- ・ Stimulation buffer を用いてアンタゴニストを 4X 濃度に調製します。希釈系列は、アンタゴニストの、予想される IC₅₀ 濃度から上下 3 log の濃度幅であることが望ましい条件です。希釈系列は、11 点調製し、アンタゴニスト濃度 0 も含め、12 点の希釈系列を 0.5 log 単位で調製します。

■ **4X Eu-cAMP tracer 溶液**

- ・ cAMP Detection Buffer を用いて、Eu-cAMP tracer ストック溶液を 50 倍希釈し、4X Eu-cAMP tracer 溶液を調製します。
- ・ 例: 245 μ L の cAMP Detection Buffer に、5 μ L の Eu-cAMP tracer を加え、穏やかに混合します。

■ **4X ULight-anti-cAMP antibody 溶液の調製**

- ・ ULight-anti-cAMP antibody ストック溶液を、cAMP Detection Buffer を用いて 150 倍希釈し、4X ULight-anti-cAMP working solution を調製します。
- ・ 例: 745 μ L の cAMP Detection Buffer に、5 μ L の ULight-anti-cAMP を加え、穏やかに混合します。

Notes:

- * 調製した試薬は 4° C で 24 時間まで保存可能です。
- * 最適なアッセイパフォーマンスを得るには、Eu-cAMP tracer と ULight-anti-cAMP の希釈率を変更しないでください。

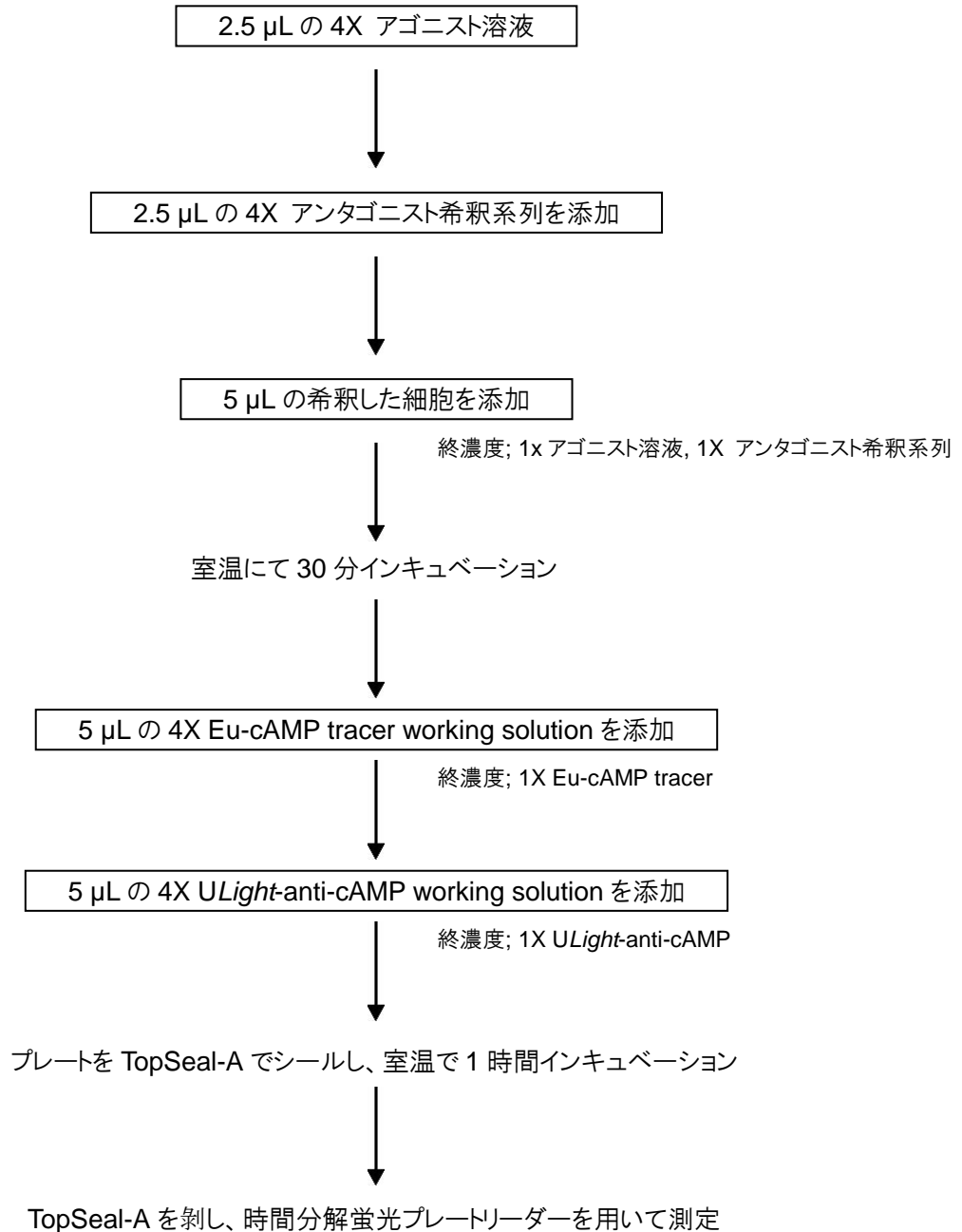
■ **細胞の希釈 Cell dilution**

細胞を希釈する前に、セクション V 細胞の調製をご覧ください。

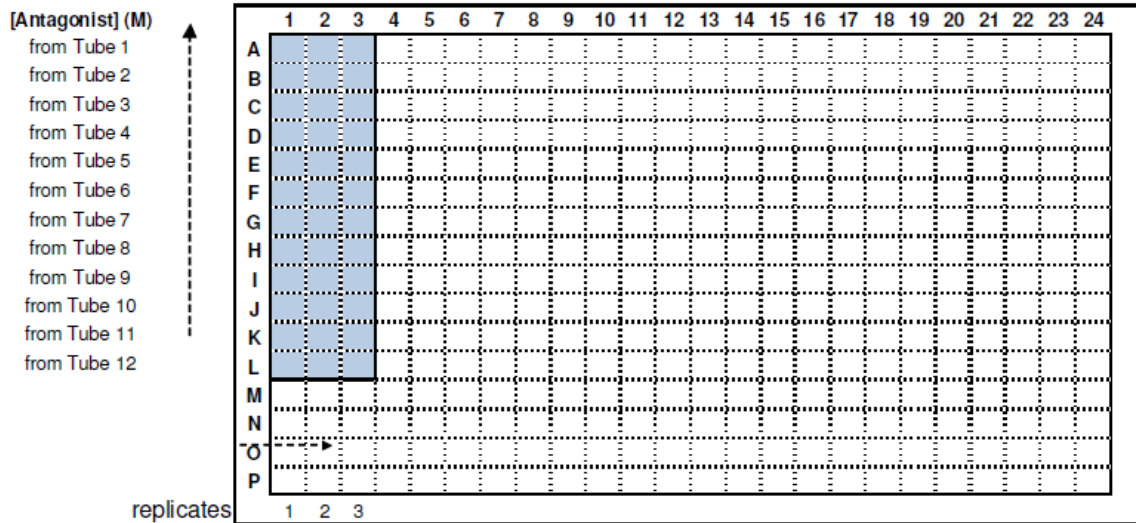
- ・ Stimulation buffer を用いて、細胞を調製します(例えば 200 cells/ μ L)。

アッセイのフローチャート:

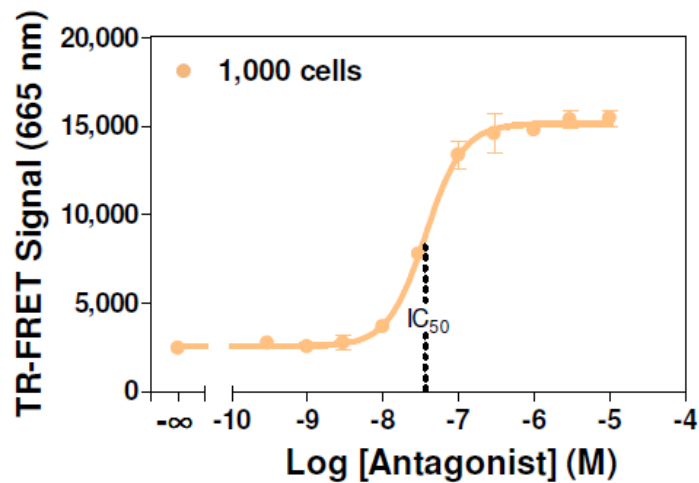
OptoPlate-384(白)を使用し、n=3 でアッセイを行います。



プレートマップ:

Gs アンタゴニスト用量-反応曲線(EnVision[®] TRF laser オプションにて測定):

アンタゴニスト濃度と、得られたシグナルを X 軸片対数グラフにプロットします。



解析結果:

アンタゴニストの IC₅₀ は、アゴニストが与える最大応答を 50% 阻害する濃度、すなわちアンタゴニスト用量-反応曲線の間接点から得られます。cAMP 産生量は、得られたシグナルを、cAMP 検量線にプロットして求めます。これによって、cAMP 産生におけるアンタゴニストの IC₅₀ を決定することができます。

X. Gi 共役受容体/ アゴニスト用量-反応曲線

試薬の調製 Reagent Preparation:

■ Stimulation buffer

- ・ 15 mL の Stimulation buffer をセクション IV に従って調製します。

■ 4X フォルスコリン溶液

- ・ EC₉₀ フォルスコリン濃度にてアッセイを行うことをお勧めします。
- ・ 5 μ L の 50 mM フォルスコリンストック溶液(セクション IV)を、495 μ L の stimulation buffer に加え、500 μ M フォルスコリンを調製後、さらに Stimulation buffer を用いて、EC₉₀ 濃度の 4X 濃度に調製します。

■ 4X アゴニスト希釈系列

- ・ Stimulation buffer を用いてアゴニストを 4X 濃度に調製します。希釈系列は、アゴニストの、予想される EC₅₀ 濃度から上下 3 log の濃度幅であることが望ましい条件です。希釈系列は、11 点調製し、アゴニスト濃度 0 も含め、12 点の希釈系列を 0.5 log 単位で調製します。

■ 4X Eu-cAMP tracer 溶液

- ・ cAMP Detection Buffer を用いて、Eu-cAMP tracer ストック溶液を 50 倍希釈し、4X Eu-cAMP tracer 溶液を調製します。
- ・ 例: 245 μ L の cAMP Detection Buffer に、5 μ L の Eu-cAMP tracer を加え、穏やかに混合します。

■ 4X ULight-anti-cAMP antibody 溶液の調製

- ・ ULight-anti-cAMP antibody ストック溶液を、cAMP Detection Buffer を用いて 150 倍希釈し、4X ULight-anti-cAMP working solution を調製します。
- ・ 例: 745 μ L の cAMP Detection Buffer に、5 μ L の ULight-anti-cAMP を加え、穏やかに混合します。

Notes:

- * 調製した試薬は 4° C で 24 時間まで保存可能です。
- * 最適なアッセイパフォーマンスを得るには、Eu-cAMP tracer と ULight-anti-cAMP の希釈率を変更しないでください。

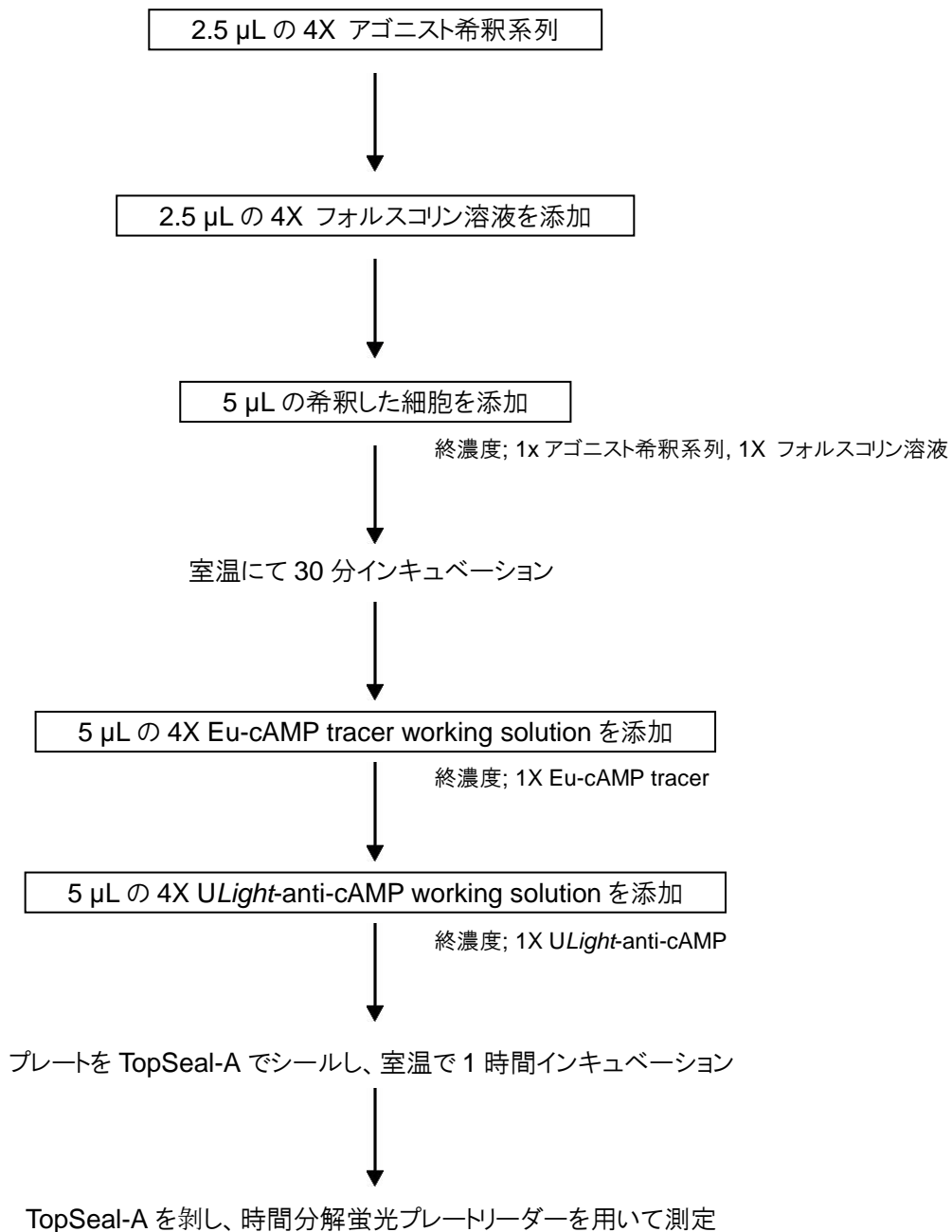
■ 細胞の希釈

細胞を希釈する前に、セクション V 細胞の調製をご覧ください。

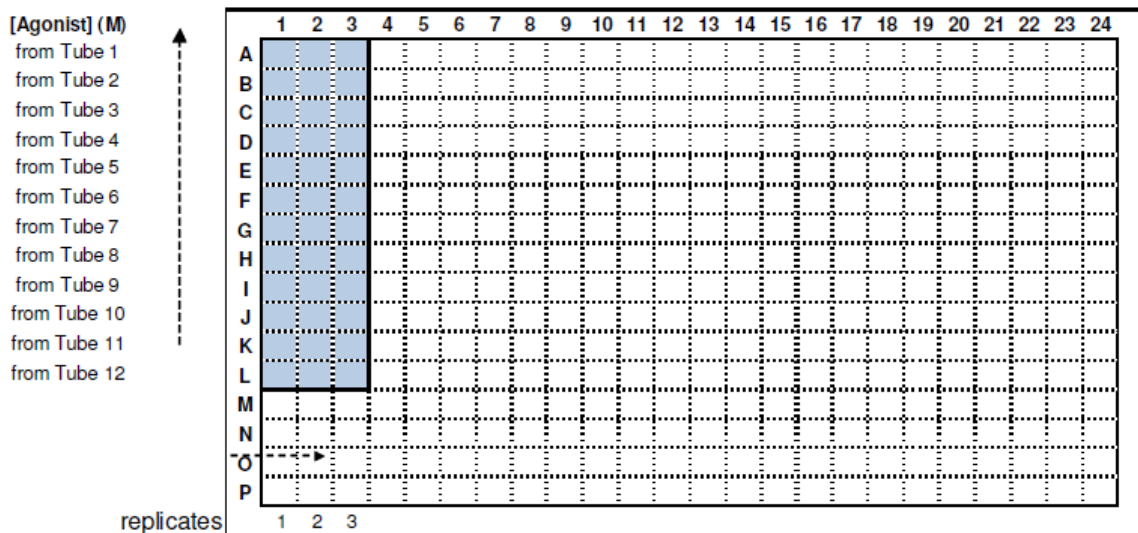
- ・ Stimulation buffer を用いて、細胞を調製します(例えば 400 cells/ μ L)。

アッセイのフローチャート Assay Flowchart

OptoPlate-384(白)を使用し、n=3 でアッセイを行います。

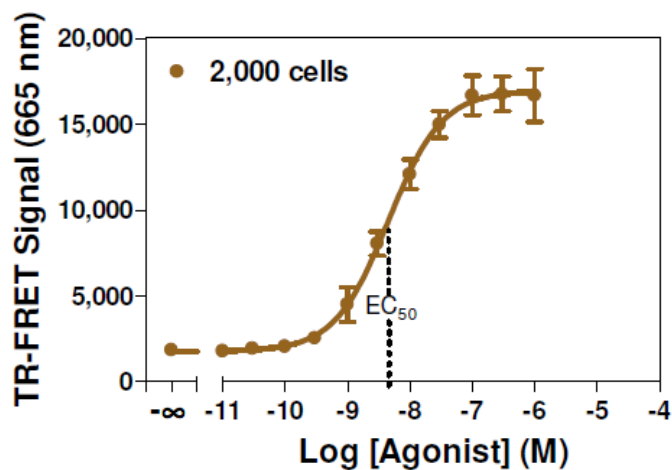


プレートマップ:



Gi アゴニスト用量-反応曲線 (EnVision[®] TRF laser オプションにて測定):

アゴニスト濃度と、得られたシグナルを X 軸片対数グラフにプロットします。



解析結果:

アゴニストの EC_{50} は、最大シグナルの 50% のシグナルを与える濃度、すなわちアゴニスト用量-反応曲線の中間点から得られます。cAMP 産生量は、得られたシグナルを、cAMP 検量線にプロットして求めます。これによって、cAMP 産生を阻害するアゴニストの EC_{50} を決定することができます。

XI. Gi 共役受容体/ アンタゴニスト用量-反応曲線

試薬の調製:

■ Stimulation buffer

- 15 mL の Stimulation buffer をセクション IV に従って調製します。

■ 4X フォルスコリン/ アゴニスト Mix

- Stimulation buffer を用いて、フォルスコリンとアゴニストをそれぞれ 4X 濃度になるよう調製します。最大のアッセイウィンドウ(S/ B)を得るために、フォルスコリンとアゴニストの EC₉₀にてアッセイを行うことをお勧めします。

■ 4X アンタゴニスト希釈系列

- Stimulation buffer を用いてアンタゴニストを 4X 濃度に調製します。希釈系列は、アンタゴニストの、予想される IC₅₀ 濃度から上下 3 log の濃度幅であることが望ましい条件です。希釈系列は、11 点調製し、アンタゴニスト濃度 0 も含め、12 点の希釈系列を 0.5 log 単位で調製します。

■ 4X Eu-cAMP tracer 溶液

- cAMP Detection Buffer を用いて、Eu-cAMP tracer ストック溶液を 50 倍希釈し、4X Eu-cAMP tracer 溶液を調製します。
- 例: 245 μ L の cAMP Detection Buffer に、5 μ L の Eu-cAMP tracer を加え、穏やかに混合します。

■ 4X ULight-anti-cAMP antibody 溶液

- ULight-anti-cAMP antibody ストック溶液を、cAMP Detection Buffer を用いて 150 倍希釈し、4X ULight-anti-cAMP working solution を調製します。
- 例: 745 μ L の cAMP Detection Buffer に、5 μ L の ULight-anti-cAMP を加え、穏やかに混合します。

Notes:

- * 調製した試薬は 4° C で 24 時間まで保存可能です。
- * 最適なアッセイパフォーマンスを得るには、Eu-cAMP tracer と ULight-anti-cAMP の希釈率を変更しないでください。

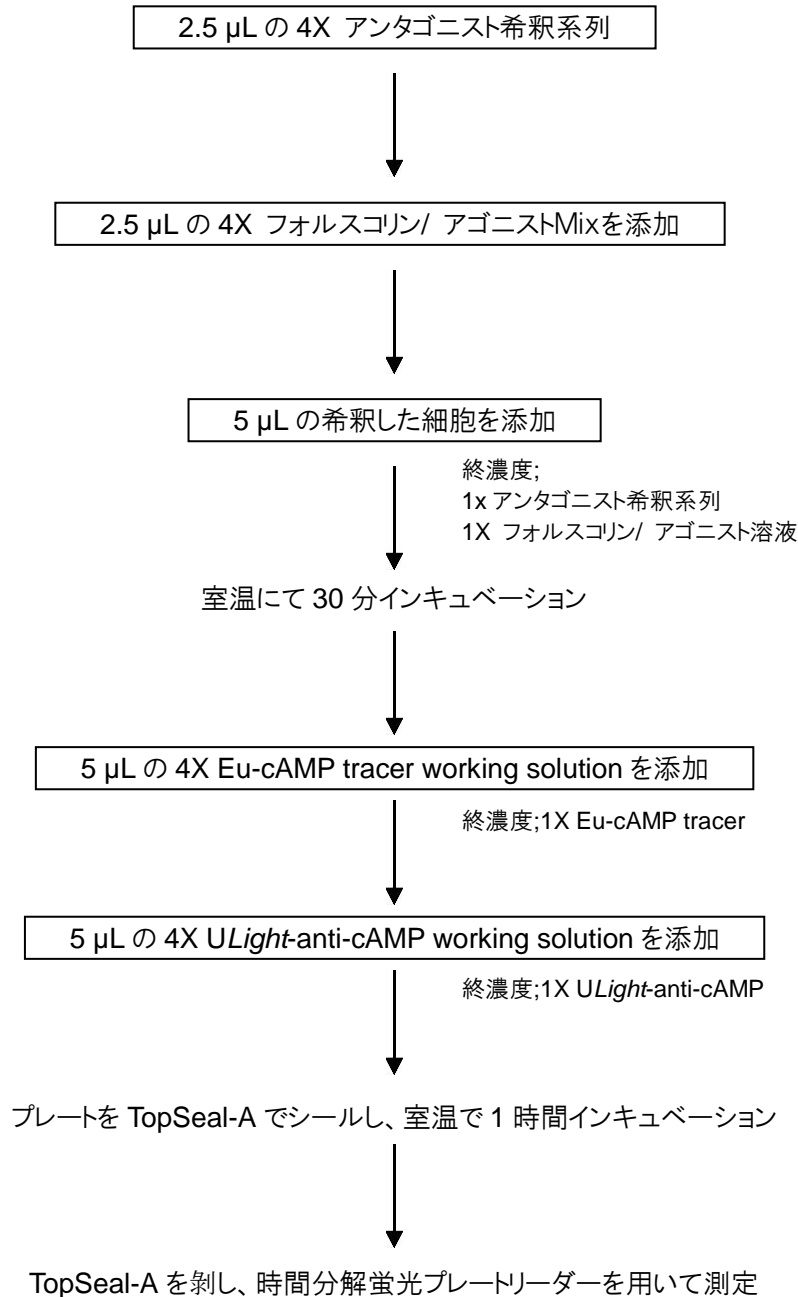
■ 細胞の希釈 Cell dilution

細胞を希釈する前に、セクション V 細胞の調製をご覧ください。

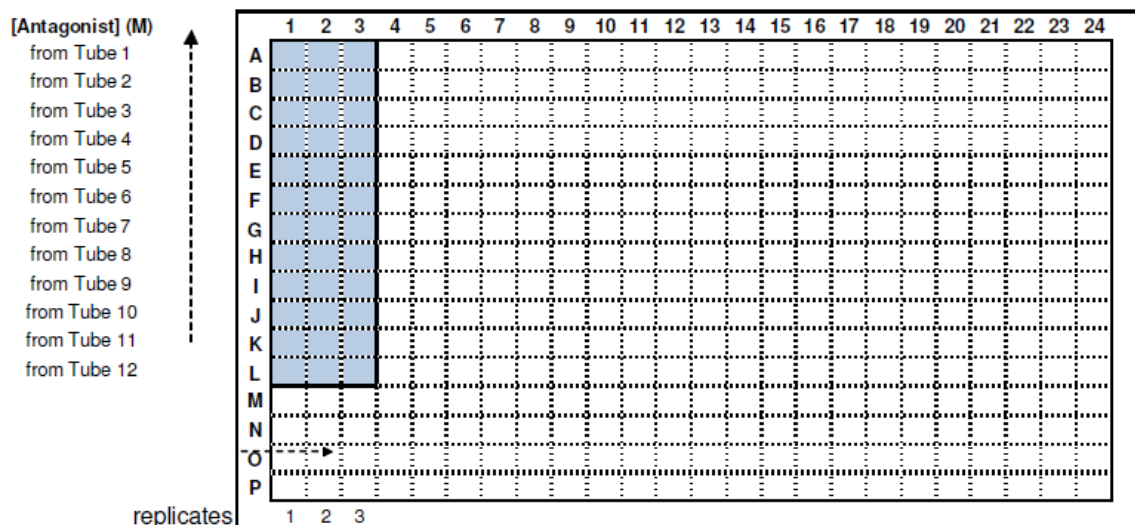
- Stimulation buffer を用いて、細胞を調製します(例えば 400 cells/ μ L)。

アッセイのフローチャート:

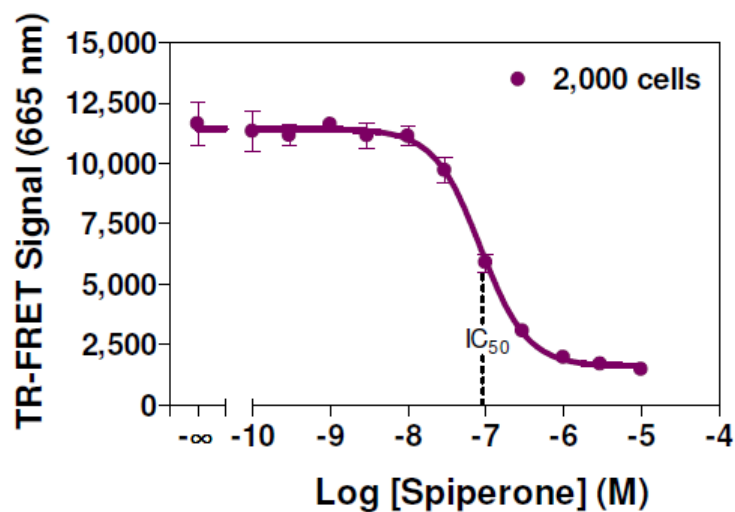
OptoPlate-384(白)を使用し、n=3 でアッセイを行います。



プレートマップ:

Gi アンタゴニスト用量-反応曲線 (EnVision[®] TRF laser オプションにて測定):

アンタゴニスト濃度と、得られたシグナルを X 軸片対数グラフにプロットします。



解析結果:

アンタゴニストの IC₅₀ は、アゴニストが与える最大応答を 50 % 阻害する濃度、すなわちアンタゴニスト用量-反応曲線の間接点から得られます。cAMP 産生量は、得られたシグナルを、cAMP 検量線にプロットして求めます。これによって、cAMP 産生を阻害するアンタゴニストの EC₅₀ を決定することができます。

XII. 2 ステップアッセイ

細胞の調製時に、4X *ULight*-anti-cAMP antibody を含む Stimulation buffer を使用することによって、アッセイのステップ数を 3 ステップから 2 ステップに減らすことが可能です。しかし、最適なアッセイパフォーマンスを得るためには、3 ステップアッセイをお勧めします。

試薬の調製:

■ **4 X *ULight*-anti-cAMP antibody in Stimulation buffer**

- 15 mL の Stimulation buffer をセクション IV に従って調製します。
- *ULight*-anti-cAMP antibody ストック溶液を、Stimulation Buffer を用いて 150 倍希釈し、4X *ULight*-anti-cAMP in Stimulation buffer を調製します。
- 例: 745 μ L の Stimulation Buffer に、5 μ L の *ULight*-anti-cAMP antibody を加え、穏やかに混合します。

■ **2X Eu-cAMP tracer 溶液**

- cAMP Detection Buffer を用いて、Eu-cAMP tracer ストック溶液を 100 倍希釈し、2X Eu-cAMP tracer 溶液を調製します。
- 例: 495 μ L の cAMP Detection Buffer に、5 μ L の Eu-cAMP tracer を加え、穏やかに混合します。

Notes:

- * 調製した試薬は 4° C で 24 時間まで保存可能です。
- * 最最適なアッセイパフォーマンスを得るには、Eu-cAMP tracer と *ULight*-anti-cAMP の希釈率を変更しないでください。
- * フォルスコリン用量-反応曲線の作製には、セクション VII に従い、2X フォルスコリン希釈系列を調製します。
- * Gs 共役受容体のアゴニストアッセイでは、セクション VIII に従い、2X アゴニスト溶液を調製します。
- * Gs 共役受容体のアンタゴニストアッセイでは、セクション IX に従い、4X アゴニスト溶液と 4X アンタゴニスト溶液を調製します。
- * Gi 共役受容体のアゴニストアッセイでは、セクション X に従い、4X フォルスコリン溶液と 4X アゴニスト溶液を調製します。
- * Gi 共役受容体のアンタゴニストアッセイでは、セクション XI に従い、4X フォルスコリン/アゴニスト Mix と 4X アンタゴニスト溶液を調製します。

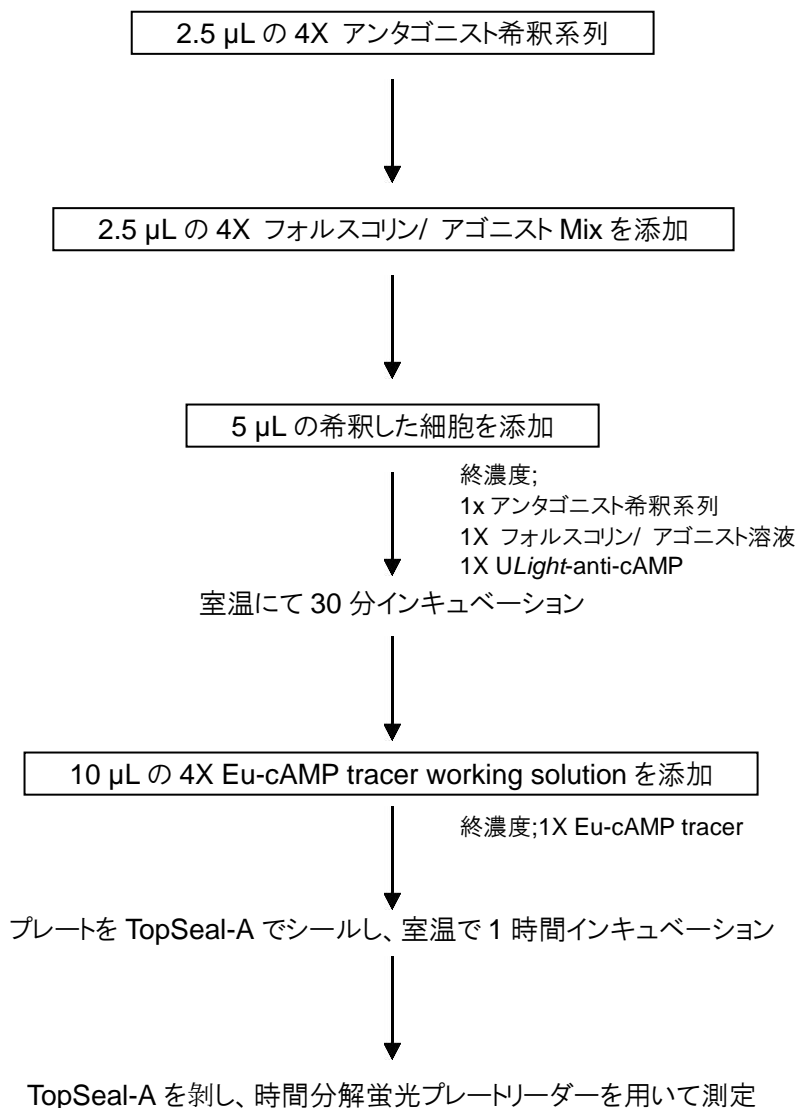
■ **細胞の希釈 Cell dilution**

細胞を希釈する前に、セクション V 細胞の調製をご覧ください。

- 4X *ULight*-anti-cAMP in Stimulation buffer を用いて、細胞を調製します。

アッセイのフローチャート:

OptoPlate-384(白)を使用し、n=3 でアッセイを行います。ここでは、Gi 共役受容体のアンタゴニストアッセイを例にしています。



Notes:

- * アッセイにおけるインキュベーション時間は、最適なアッセイウィンドウ(S/ B)を得ることができる条件を決定する必要があります。

XIII. 使用機器とセッティング

パラメーター	ARVO™	EnVision® Lamp/Laser	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 and 665 (locked protocols)	N/A	N/A
Emission Filter	1) 615 2) 665	1) 203 - Eu 615 2) 205 - APC 665	1) 618/8 (Eu) 2) 671/8 (LANCE)
Delay Time	50 μ s	50 μ s	50 μ s
Readout Speed, Gain and Binning	N/A	N/A	Medium, High and 2x
Number of Flashes	N/A	Lamp: 100 Laser: 20	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	Lamp: 2000 μ s Laser: 16600 μ s	N/A



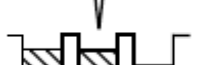
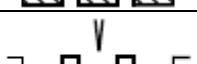


* ViewLux®を使用する時には、Measurement time 20 seconds の設定を推奨します。

** シグナルが著しく低い場合は、100 μ s にしてください。

Note:

シグナル強度とS/Bは、測定する機器に大きく依存しますが、アッセイの安定性と感度にはほとんど影響しません。

XIV. 推奨アッセイボリューム

		OptiPlate -96	OptiPlate -384	OptiPlate -1536
トータルアッセイボリューム		40 μ L	20 μ L	8 μ L
化合物希釈系列 +細胞		20 μ L	10 μ L	4 μ L
インキュベーション		室温にて 30 分		
Eu-cAMP tracer 添加量		10 μ L	5 μ L	2 μ L
ULight-anti-cAMP 添加量		10 μ L	5 μ L	2 μ L
インキュベーション		室温にて 30 分		
測定		機器の設定を確認		

XV. 注意

- それぞれのロットのアッセイパフォーマンスを維持するため、異なるロット番号のキットに付属する試薬を混合しないでください。
- チューブの蓋などに内容物が付着していることがあるため、ご使用前に試薬チューブを軽く遠心してください。
- **ULight-labeled cAMP solutions は、穏やかに攪拌し、ボルテックスは避けてください。**
- 使用するプレートには、白色の OptiPlate を推奨します。黒色プレートを使用すると、シグナルと S/B が低下します。
- **シグナル測定時には、TopSeal-A などのシールを剥してから測定してください。**
- Stimulation buffer には、終濃度 0.1 %の BSA を加えることをお勧めします。アッセイ条件によっては、BSA 濃度を低減することが必要な可能性もあります。
- Eu キレート安定化のため、金属イオンフリー精製を行った BSA (7.5% BSA Stabilizer Solution)を使用しています。アッセイの再現性を保つため、他の精製グレードの BSA を使用しないでください。

XVI. FAQ(よくあるご質問)

1. アッセイ可能な受容体の最小発現量はどのくらいですか？

受容体発現の最小量は、特に決まっていません。いくつかの内在性受容体は、大量の cAMP 産生を誘導することが示されています。受容体と G タンパク質(Gi, Gs)、アデニル酸シクラーゼの共役の強さが、cAMP アッセイの安定性を決める最も重要な要素です。

LANCE Ultra cAMP アッセイは、極めて高感度なため、低レベルの cAMP 産生も測定可能です。

2. 一過性の受容体発現細胞あるいは安定発現細胞を使用できますか？

一過性の発現、安定発現共に、アデニル酸シクラーゼ活性化において、高い応答性を示すため、どちらの細胞も使用できます。

3. 凍結細胞を使用できますか？

使用できます。特に、PerkinElmer の凍結細胞 cAMPZen は、アデニル酸シクラーゼ活性化において、高い応答性を示します。

4. アッセイに使用する細胞数はどのくらいですか？

細胞数は、刺激前の細胞において産生される量(basal level)や、刺激後、アデニル酸シクラーゼの活性化によって産生される cAMP 量に、大きな影響を与えます。至適細胞数を検討することによって、細胞刺激前と刺激後のそれぞれのシグナルから得られるアッセイウィンドウ(S/ B)を最大にすることができます。

5. 細胞刺激のタイムコース実験は必要ですか？

刺激時間は、cAMP アッセイにおける重要な要素です。アッセイの至適細胞数を決めた後、まずは刺激後 30 分の細胞を使用することをお勧めします。刺激時間は、15 分から 2 時間の間でタイムコースを取る必要があります。アッセイに使用する細胞種や受容体、アゴニストに、刺激時間は大きく依存します。

6. 接着細胞を用いてアッセイ可能ですか？

接着細胞、接着剥離後の細胞共に使用可能です。接着細胞を使用する時には、アッセイ前に 1X HBSS を用いて細胞をリンスし、培地の除去をお勧めします。

7. 膜画分を細胞の代わりに使用できますか？

Gs 共役受容体が発現している膜画分を用いたアッセイでは、適度な MgCl₂, GTP, GDP, ATP 濃度の Stimulation buffer を用いると、良い結果が得られることを確認しています。アッセイでは、主に 1-5 µg/ well 程度の膜画分の使用をお勧めしますが、アッセイ条件を最適化するために、膜画分量と膜画分中の MgCl₂, GTP, GDP や ATP 濃度を検討する必要があります。

8. IBMX はアッセイに干渉しますか？

IBMX は、ホスホジエステラーゼ阻害剤として広く使用されています。0.5 mM IBMX を含む Stimulation buffer の使用をお勧めします。この濃度であれば、cAMP 検量線のシグナル低下を招きません。細胞ベースのアッセイでは、使用する細胞種によって IBMX の至適濃度を検討する必要があります。

9. DMSO はアッセイに干渉しますか？

細胞の刺激時において、DMSO 濃度 2 %までは、アッセイパフォーマンスに影響しません。しかし、使用する細胞種によって DMSO 耐性を検討する必要があります。

10. Detection Buffer のみ少なくなりました。購入できますか？

CR97-100, LANCE Detection Buffer, 10X conc. 250 mL をご購入ください。LANCE Detection Buffer 10X conc.は、0.4 % NaN_3 を含み、医薬用外毒物に該当します。

Legal notice

EnVision, ViewLux, cAMPZen and LANCE are registered trademarks of PerkinElmer. Topseal-A, ULight and Victor are trademarks of PerkinElmer. Other trademarks are the property of their respective owner. The ULight dye is claimed in PCT Application No. PCT/US2010/021282.

- * 記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。
- * 本カタログに記載されている全ての製品は、試験研究目的にのみご使用いただけます。



株式会社 パーキンエルマー・ジャパン

www.perkinelmer.co.jp

バイオディスカバリー事業部

横浜本社 〒240-0005 横浜市保土ヶ谷区神戸町 134

横浜ビジネスパーク テクニカルセンター4F

TEL: (045) 339-5862(代) FAX: (045) 339-5872

大阪支社 〒564-0051 大阪府吹田市豊津町 5-3

TEL: (06) 6386-1771(代) FAX: (06) 6386-6401

東京営業所 〒101-0024 東京都千代田区神田和泉町 1-7-17

CTKビル 5F

TEL: (03) 3866-2647(代) FAX: (03) 3866-2652