

LANCE[®] Ultra cAMP Kit

For Research Use Only

1. 使用目的

LANCE Ultra cAMP キットは、培養細胞及び細胞膜を用いた Adenosine 3',5'-cyclicphosphate (cAMP) の定量を目的としています。

2. 内容

Component	TRF0262 1,000 points*	TRF0263 10,000 points*	TRF0264 50,000 points*
cAMP standard, 50 μM	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**	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

* 標準プロトコールに従った場合 (20-μL assay in 384-well microplates).

** キャップの内側に液が付着していることがあるため、ご使用前にチューブを軽く遠心してください。

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。他はすべて 4° C 保存です。

3. 保存条件

すべての試薬は、遮光条件下、2-8°C で保存してください。消費期限は、外装箱に記載されています。

4. 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)による調節を受けて産生される 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) 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)。

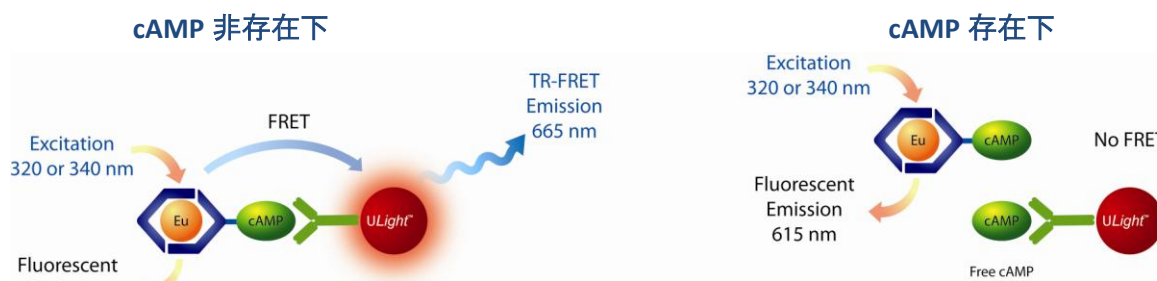


図 1. LANCE[®] Ultra cAMP アッセイの原理

5. キット以外に必要な試薬/消耗品

試薬/消耗品	メーカー	製品番号.
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (1X) (no phenol red)	Invitrogen	14025-092
HEPES Buffer Solution (1 M) pH 7.2 to 7.5	Invitrogen	15630-080
Forskolin	Sigma	F6886
IBMX	Sigma	I7018
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

6. アッセイの最適化

細胞の刺激条件と 1 ウェルあたりに使用する細胞数は、細胞株や受容体ごとに異なるため、アッセイの最適化に重要です。このため、フォルスコリン(G_s , G_i 共役型受容体の場合)やフルアゴニスト(G_s 共役型受容体の場合)の反応曲線を作製し、1 ウェルあたりの至適細胞数を決定することを推奨します。

384-well プレートを使用する時(アッセイボリューム 20 μ L)には、通常、1 ウェルあたりの細胞数 250 から 5,000 までの範囲を検討します。

フォルスコリンあるいはアゴニスト反応曲線の直線領域が、cAMP 検量線の直線領域に当てはまり、S/B (Signal to Background)比が、cAMP 検量線から得られた S/B 比とほぼ一致する時の細胞数を、至適細胞数とします。このときの最大シグナルは、刺激を加えていない細胞から得られた値であり、最小シグナルは、フォルスコリンあるいはアゴニストの最大刺激濃度条件において完全に活性化された細胞から得られた値です。

下図 2 の場合、2,000 細胞/ウェルが至適細胞数となります。

詳細なアッセイの至適条件検討は、「LANCE Ultra cAMP kit アッセイセットアップガイド」をご覧ください。

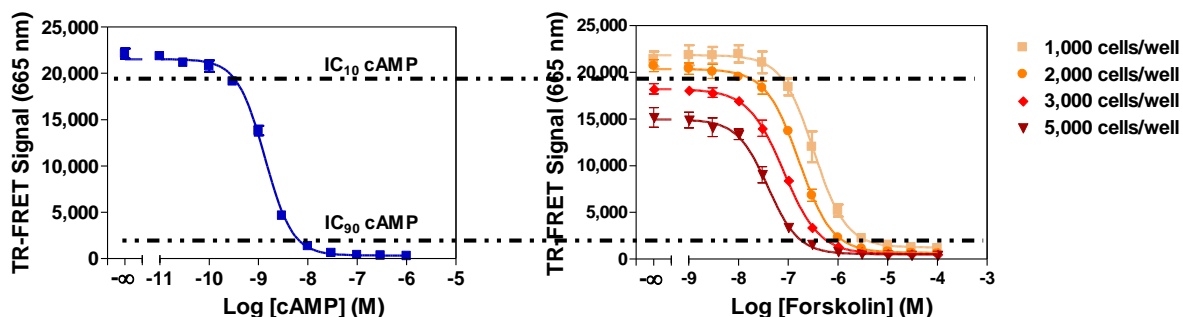


図 2 cAMP 検量線と各細胞数におけるフォルスコリン反応曲線

試薬の調製

6.1 Stimulation Buffer の調製

細胞を使用したアッセイにおいて、推奨する Stimulation Buffer の組成は、**1X HBSS, 5 mM HEPES, 0.5 mM IBMX, 0.1% BSA (pH 7.4)**です。用時調製してください。

NOTES:

- cAMP 検量線の作製時にも、**0.5 mM IBMX** を Stimulation Buffer に加えてください。
- 金属イオンのコンタミネーションを避けるため、キット付属の高純度 **BSA (7.5% solution)** を使用してください。

チューブに以下を加え、15 mL の Stimulation Buffer を調整します。

- 14 mL の 1X HBSS (Invitrogen, cat. # 14025-092)
- 75 μ L の 1M HEPES (Invitrogen, cat. # 15630-080)
- 15 μ L の 500 mM IBMX (Sigma, cat.# I7018)
- 200 μ L の 7.5% BSA Stabilizer (キット付属)
- 0.1N NaOH を用いて pH 7.4 に調節し、トータルボリュームを 15 mL にします。

6.2 検量線用 cAMP 希釈系列溶液の調製

50 μ M cAMP スタンダードを、Stimulation Buffer を用いて下記に従い希釈し、4X cAMP 希釈系列を調製します。

希釈番号	[終濃度] (M)	[4X] (M)	Volume of dilution	Stimulation Buffer
1	1×10^{-6}	4×10^{-6}	8 μ L of 50 μ M cAMP	92 μ L
2	3×10^{-7}	1.2×10^{-6}	30 μ L of 1	70 μ L
3	1×10^{-7}	4×10^{-7}	30 μ L of 2	60 μ L
4	3×10^{-8}	1.2×10^{-7}	30 μ L of 3	70 μ L
5	1×10^{-8}	4×10^{-8}	30 μ L of 4	60 μ L
6	3×10^{-9}	1.2×10^{-8}	30 μ L of 5	70 μ L
7	1×10^{-9}	4×10^{-9}	30 μ L of 6	60 μ L
8	3×10^{-10}	1.2×10^{-9}	30 μ L of 7	70 μ L
9	1×10^{-10}	4×10^{-10}	30 μ L of 8	60 μ L
10	3×10^{-11}	1.2×10^{-10}	30 μ L of 9	70 μ L
11	1×10^{-11}	4×10^{-11}	30 μ L of 10	60 μ L
12 (ctrl)	0	0	-	70 μ L

6.3 Eu-cAMP tracer solution の調製

Eu-cAMP tracer ストック溶液を、cAMP Detection Buffer を用いて 50 倍希釈し、**4X Eu-cAMP tracer working solution** 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。

6.4 ULight-anti-cAMP solution の調製

ULight-anti-cAMP 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ためには、Eu-cAMP tracer と ULight-anti-cAMP の希釈率を変更しないようお勧めします。

7. 384-well プレート(トータル 20 μL)におけるアッセイプロトコール

下表に従って、試薬を添加します。

アッセイに使用する細胞と化合物は、必ず 0.5 mM IBMX を含む Stimulation Buffer を用いて調製してください。cAMP Detection Buffer は、Eu-cAMP tracer と ULight-anti-cAMP working solution の調製にのみ使用してください。

cAMP 検量線	Gs アゴニスト	Gs アンタゴニスト	Gi フォルスコリン曲線	Gi アゴニスト	Gi アンタゴニスト
5 μL cAMP スタンダード	5 μL cell suspension	5 μL cell suspension	5 μL cell suspension	5 μL cell suspension	5 μL cell suspension
5 μL Stimulation Buffer	5 μL アゴニスト	2.5 μL アゴニスト	5 μL フォルスコリン	2.5 μL フォルスコリン	2.5 μL フォルスコリン/ アゴニスト
-	-	2.5 μL アンタゴニスト	-	2.5 μL アゴニスト	2.5 μL アンタゴニスト
室温にて 30 分間インキュベーションします*。(cAMP 検量線作製には必要ありません。)					
5 μL 4X Eu-cAMP tracer working solution					
5 μL 4X ULight-anti-cAMP working solution					
室温にて 1 時間インキュベーションします*。					
TR-FRET microplate reader を用いて測定します。測定前にシールは剥してください。					

* プレートは、TopSeal™-A (Cat. # 6005250)にてカバーしてください。

NOTES:

- 試薬を添加後 24 時間経過しても、得られる IC₅₀ (EC₅₀)に大きな変化はありません。
- 試薬添加ステップを少なくするために、あらかじめ 4X ULight-anti-cAMP を含む Stimulation Buffer を用いて調製した、細胞溶液を 5 μL 使用することが可能です。この時、トータルアッセイボリュームを 20 μL に保つため、10 μL の 2X Eu-cAMP tracer (cAMP Detection Buffer を用いて調製)をアッセイに使用してください。
- 96-well あるいは 1536-well プレートを用いる場合、それぞれのプレートに適したトータルボリュームにてアッセイを行ってください。この時、トータルボリュームに対するそれぞれの試薬量比が変化することのないよう、ご注意ください。
- ロットそれぞれ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含まれる試薬を、混合して使用しないでください。

8. 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 μs	50 μs	50 μs
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 μs (200 μs**)	100 μs (200 μs**)	354 μs
Mirror Module	N/A	462 (D400/D630) or 412 (D400)	N/A
Cycle	2000 μs	Lamp: 2000 μs Laser: 16600 μs	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 μs にしてください。

9. LANCE Ultra cAMP 検量線(例)

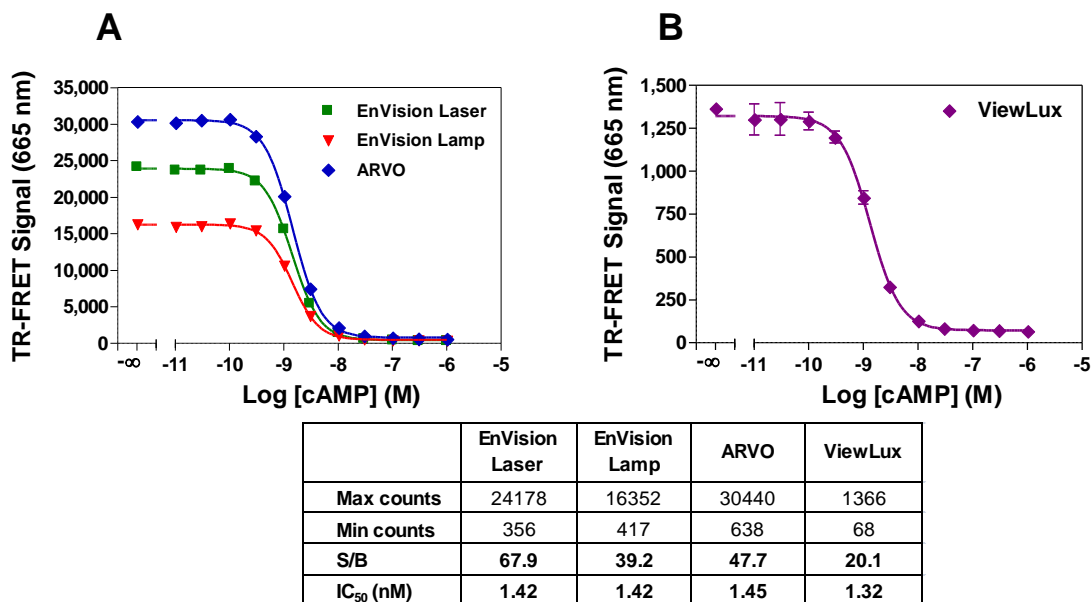


図3 それぞれのプレートリーダーを用いた時の cAMP 検量線の比較

OptiPlate™-384(白)を使用し、室温にて1時間インキュベート後に得られた cAMP 検量線を比較。(A) EnVision®(laserあるいはlamp)、ARVO™、(B) ViewLux®を用いた。

NOTE: 得られるカウントと S/B 比は、使用する機器に依存しますが、アッセイの安定性と IC₅₀ に影響はありません。

- * 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