

HUMAN HEALTH

ENVIRONMENTAL HEALTH

AlphaScreen[®] SureFire[®] Cellular Kinase Assays ユーザーガイド

CHOOSE
the PATHWAY

For Laboratory Use Only


PerkinElmer[®]
For the Better

RESEARCH REAGENTS FOR
RESEARCH PURPOSES ONLY

はじめに	3
フレキシブルなホモジニアスアッセイ	3
HTS への適合性	3
ALPHASCREEN® SUREFIRE® アッセイの原理	3
キット内容	4
コントロール細胞溶解液	4
REACTION BUFFER	4
LYSIS BUFFER	4
ACTIVATION BUFFER	4
DILUTION BUFFER	4
有効期間	4
プロトコール	9
接着細胞と浮遊細胞	9
トランスファープロトコールとシングルウェルプロトコール	9
1 ステップ vs 2 ステップアッセイ	10
トランスファープロトコール(標準プロトコール;接着細胞を使用)	11
シングルウェルプロトコール(接着細胞を使用)	14
浮遊細胞を用いたプロトコール	16
アッセイの最適化	18
アッセイフォーマットの選択	18
細胞播種密度	18
細胞培養条件	18
刺激時間	18
アッセイバッファーと DMSO 耐性	19
細胞の溶解	19
ALPHASCREEN BEADS 濃度	19
インキュベーション時間	19
最大アッセイウィンドウと基底リン酸化レベル	20
トラブルシューティング	21
カウントが低い	21
バックグラウンドが高い	21
感度が不十分	21
細胞が十分刺激されていない	22
日間差	22
FAQ	23

はじめに

AlphaScreen® SureFire®は、細胞内在のリン酸化タンパク質を、直接検出できるアッセイです。細胞溶解液に SureFire キットの試薬を添加するだけで、洗浄操作を行うことなく細胞内シグナル伝達を検出できます。

SureFire キットは、AlphaScreen IgG (Protein A) Detection Kit (Cat# 6760617M, 6760617R, 6760617C)と別パッケージのため、両キットともににお求めください。

フレキシブルなホモジニアスアッセイ

AlphaScreen SureFire Assayでは、細胞内に存在するリン酸化タンパク質を測定します。シグナル伝達パスウェイが活性化され、十分量の標的タンパク質が発現している状態であれば、初代培養細胞を含め多種類の細胞を使用することができます。キナーゼなどのタンパク質をトランスフェクトさせた細胞も使用できます。

SureFireには、活性化された細胞内キナーゼを検出するための様々なアプリケーションがあります。アゴニストによって活性化された細胞内キナーゼパスウェイをSureFireで検出することによって、Gタンパク共役型受容体(GPCR)やサイトカイン受容体、受容体型チロシンキナーゼ(RTK)などの受容体に対する調節因子の観察に使用できます。ゆえにアゴニストやアンタゴニストアッセイにも有効です。SureFireを用いた細胞内リン酸化アッセイでは、例えば、PI3キナーゼパスウェイあるいはMAPKパスウェイ(例: インスリンシグナル伝達)を介したRTKシグナル伝達、MAPK、TGFβ、あるいはNFκBのリン酸化を介した炎症性受容体シグナル伝達、JAK/STATリン酸化を介したサイトカイン受容体の活性化などを標的とした、数々のアッセイキットをラインナップしています。ラインナップは随時追加していますので、最新の製品は弊社HPにてご確認ください。

www.perkinelmer.co.jp/products_ls/assays/assays_0510.html

HTS への適合性

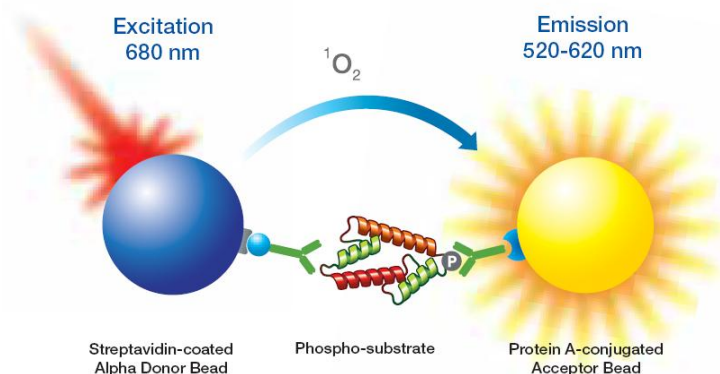
AlphaScreen SureFire は、1枚のプレートから数百枚のプレートまでアッセイ可能です。少量化が容易で、かつホモジニアスアッセイであるため、迅速性と正確性が要求されるハイスループットスクリーニングに適しています。

AlphaScreen® SureFire® アッセイの原理

SureFire では、イムノサンドイッチ法を用いてリン酸化タンパク質を検出します。一方の抗体(抗リン酸化抗体)は標的タンパク質上のリン酸化領域と特異的に結合し、もう片方(標的タンパク質に特異的な抗体)は、標的タンパク質上のリン酸化領域から離れたエピトープと特異的に結合します。すなわち、後者の抗体は、標的タンパク質のリン酸化に依存せず結合し、抗リン酸化抗体は、標的タンパク質に特異的な細胞内シグナル伝達カスケードによって標的タンパク質がリン酸化されたときにのみ、結合します。これにより形成される、標的タンパク質特異的抗体・抗リン酸化抗体・標的タンパク質の複合体の量は、細胞溶解液中のリン酸化標的タンパク質の量に依存します。

SureFire アッセイには、AlphaScreen IgG (Protein A)キットが必要です。AlphaScreen は、2種類のビーズの近接をベースとしたテクノロジーであり、ドナービーズとアクセプタービーズが近接した時にのみシグナルを放出します。SureFire キットに含まれている抗体は、ドナービーズ、またはアクセプタービーズとそれぞれ特異的に結合するようデザインされています。このため、両方の抗体が標的に結合して形成された複合体のみが両ビーズに結合でき、シグナルが検出されます。

AlphaScreen SureFire® Technology



キット内容

SureFire キットは、以下の内容物にて構成されています。

- Control lysates
- Reaction buffer
- Lysis buffer
- Activation buffer
- Dilution buffer (only supplied with 2-step kits)

各内容物の量と推奨する取り扱い方法は、キットごとに詳細を表 1、2 に記載しています。また、キット以外に必要な試薬・消耗品を表 3 に記載しています。

コントロール細胞溶解液

細胞溶解液(凍結乾燥品)は、キット付属の試薬の確認に使用します。ネガティブコントロールは、刺激を与えていない、あるいはシグナル伝達を抑制した細胞から調製した細胞溶解液です。ポジティブコントロールは、標的タンパクのリン酸化促進アゴニストによって刺激された細胞から調製した細胞溶解液です。コントロールに使用される細胞株は、キット毎に異なり、標的リン酸化タンパク質を検出可能なレベルで発現しているものを用いています。コントロールから得られるシグナルは、細胞株毎に発現レベルが異なるため、他の細胞株で得られるシグナルと大きく異なることがあります。

コントロール細胞溶解液は-20℃で保存し、一度水に溶解させた細胞溶解液は、凍結融解を避け、小分けして-20℃に保存してください。

Reaction buffer

Reaction buffer には、最低 2 種類の抗体が含まれ、Activation buffer、AlphaScreen Protein A kit と混合し、プレミックスとして使用します。アッセイに必要な抗体を含んでいるため、凍結を避け必ず 4 °C にて保存してください。ボルテックスは必須ではありませんので、できるだけ避けてください。沈殿物が生じた場合は使用できません。

Lysis Buffer

5X Lysis buffer には、界面活性剤とホスファターゼ阻害剤が含まれ、ゲノム DNA を遊離させることなく細胞を溶解させます。幅広い細胞種に使用できますが、細胞種によっては、プロテアーゼ阻害剤や更に界面活性剤の添加が必要なことがあります。この時、添加した試薬が、アッセイに干渉しないことの確認が必要です。

Activation buffer

Activation buffer は、検出感度向上に必要です。通常、4 °C にて保存すると沈殿物が生じますので、使用前に室温で必ず溶解させてください。37 °C にて 5-10 分間インキュベートすると、容易に溶解します。この操作が面倒であれば、室温にて保存してください。室温でも沈殿物が生じた時は、前述の方法にて溶解させてください。

Dilution buffer

SureFire Dilution buffer は、AlphaScreen ドナービーズの希釈に使用します。これは、2 ステップアッセイにのみ必要です。1 ステップアッセイには必要ありません。必ず 4 °C にて保存してください。アッセイステップは、キットによって異なります。

有効期間

キットは表示通りに保存してください。製造日から 6-9 ヶ月が有効期間として保証されます。

表 1: SureFire® 1 ステップアッセイキット 内容物、バッファの調製と保存条件

キットサイズ	500 Point	10000 Point	50000 Point
Lysis Buffer (5X)	5 X 2 mL	4 X 60 mL	3 X 400 mL
Activation Buffer	1 X 2 mL	1 X 60 mL	1 X 300 mL
Reaction Buffer	2 X 1.7 mL	2 X 35 mL	1 X 360 mL
Assay Control (lyophilized) Un-stimulated Cell Lysate Stimulated Cell Lysate	250 µL 250 µL	250 µL 250 µL	250 µL 250 µL

5X Lysis buffer	4 °C で保存してください。1Xに希釈後、余った 1X buffer は、5 回まで活性を失うことなく凍結・解凍することができます。 Lysis buffer は、すべての SureFire キットに共通して使用できます。
Activation buffer	4 °C で沈殿することがあります。37 °C に温め緩やかに混ぜて再溶解してください。 Activation buffer は室温で活性を失うことなく保存できます。 Activation buffer は、すべての SureFire キットに共通して使用できます。
Reaction buffer	4 °C に保ってご使用ください。凍結しないでください。 一度希釈し、使用しなかった Reaction buffer は破棄してください。
AlphaScreen® Protein A IgG Kit	遮光し、4 °C で保存してください。
Reaction buffer + Activation buffer + AlphaScreen® beads	キット付属のマニュアルに従って調製してください。 調製は遮光条件下、室温で行い、同日中に使用してください。
Assay control samples Un-stimulated cell lysate Stimulated cell lysate	凍結乾燥品は、-20 °C でキットの期限まで安定です。水での調製は室温 15 分間、ピペティングにより混合してください。一度調製した細胞溶解液は 1 回使用分に分量し-20 °C で保存、1 カ月以内に使い切ってください。

表 2: SureFire® 2 ステップアッセイキット 内容物、バッファの調製と保存条件

キットサイズ	500 Point	10000 Point	50000 Point
Lysis Buffer (5X)	5 X 2 mL	4 X 60 mL	3 X 400 mL
Activation Buffer	1 X 2 mL	1 X 60 mL	1 X 300 mL
Reaction Buffer	2 X 1.3 mL	1 X 45 mL	1 X 225 mL
Dilution Buffer	1 X 1.5 mL	1 X 25 mL	2 X 60 mL
Assay Control Samples (lyophilized)			
Un-stimulated Cell Lysate	250 µL	250 µL	250 µL
Stimulated Cell Lysate	250 µL	250 µL	250 µL

5X Lysis buffer	4 °C で保存してください。1Xに希釈後、余った 1X buffer は、5 回まで活性を失うことなく凍結・解凍することができます。 Lysis buffer は、すべての SureFire キットに共通して使用できます。
Activation buffer	4 °C で沈殿することがあります。37 °C に温め緩やかに混ぜて再溶解してください。Activation buffer は室温で活性を失うことなく保存できます。 Activation buffer は、すべての SureFire キットに共通して使用できます。
Reaction buffer	4 °C に保ってご使用ください。凍結をしないでください。 一度希釈し、使用しなかった Reaction buffer は破棄してください。
AlphaScreen® Protein A IgG Kit	遮光、4 °C で保存してください。
Reaction buffer + Activation buffer and AlphaScreen® Acceptor beads	キット付属のマニュアルに従って調製してください。 調製は室温で行い、同日中に使用してください。
Dilution buffer + AlphaScreen® Donor beads	キット付属のマニュアルに従って調製してください。 調製は遮光条件下、室温で行い、同日中に使用してください。
Assay control samples Un-stimulated cell lysate Stimulated cell lysate	凍結乾燥品は、-20 °C でキットの期限まで安定です。水での調製は室温 15 分間、ピペティングにより混合してください。一度調製した細胞溶解液は 1 回使用分に分量し-20 °C で保存、1 カ月以内に使い切ってください。

表 3: SureFire®キット以外に必要な試薬・消耗品

試薬

製品名	数量(アッセイポイント)	製品コード
AlphaScreen Protein A detection kit	500 points	6760617C
	10,000 points	6760617M
	50,000 points	6760617R

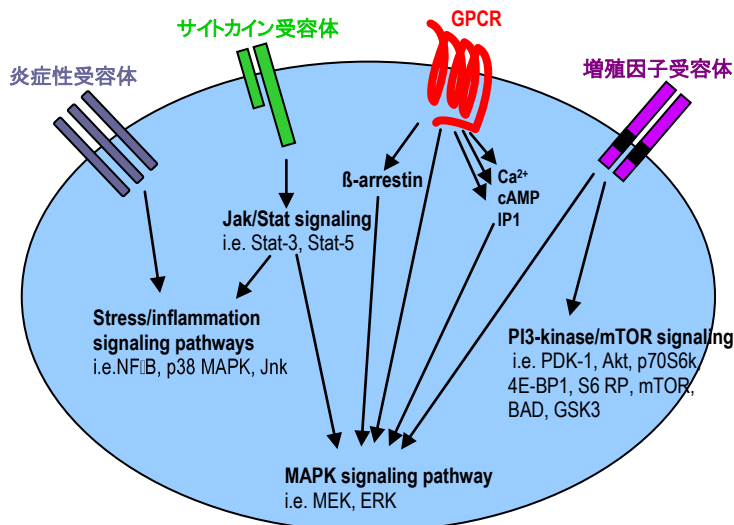
推奨マイクロプレート

アッセイ フォーマット	製品名	数量(枚)	製品 コード	ウェル 容量	推奨アッセイ容量
96	½ AreaPlate-96	50	6005560	180 µL	50 µL
		200	6005569		
384	AlphaPlate™-384	50	6005350	105 µL	20-50 µL
	AlphaPlate shallow well-384	200	6005359		
1536	AlphaPlate-1536	50	6004350	30 µL	10-20 µL (標準プロトコール)
		200	6008359		
		50	6004350	12 µL	5-10 µL
		200	6004359		

標的タンパク質の選択

SureFire は、下記の細胞内シグナル伝達のアッセイに使用できます。

- MAPK シグナル
- Akt シグナル
- 翻訳制御
- NFκB シグナル
- TGFβ/Smad シグナル
- アポトーシス
- チロシンキナーゼ受容体
- GPCR シグナル

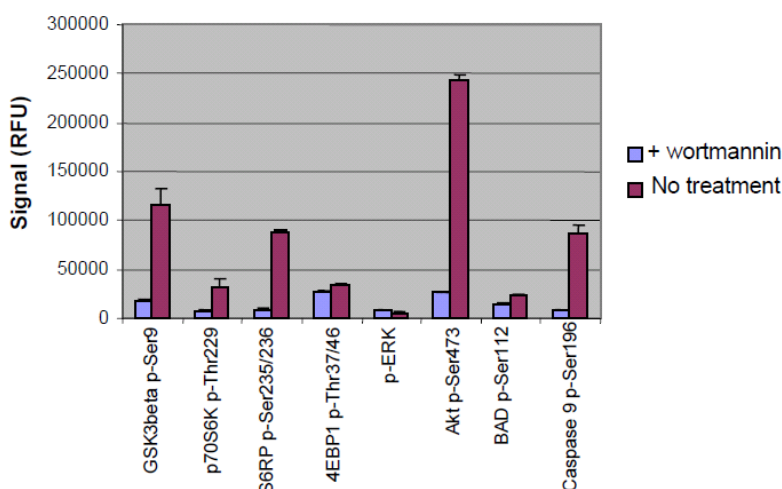


各パスウェイ毎に、複数の SureFire キットがあり、異なる標的タンパク質、あるいは同じタンパク質であっても、異なるリン酸化領域を検出することができます。このため、様々な細胞株に使用可能だけでなく、一つのシグナル伝達パスウェイにおいて複数のキナーゼが発現しているかも解析することができます。

SureFire アッセイで使用する細胞溶解液は 4 μL/1 well と少量のため、1 well の培養細胞から得た細胞溶解液を用いて、多種類の標的タンパク質を測定可能です。これによって、化合物の特異的、あるいは非特異的な作用を推測できます。また、阻害剤を添加、または添加していない細胞培養液から、簡単に細胞溶解液の調製と標的タンパク質の解析を行うことができるため、研究対象のキナーゼカスケードにおいて、どの標的タンパク質が検出可能かということも、迅速に明らかにすることができます。

標的タンパク質の発現レベルは細胞株によって大きく変動する可能性があり、細胞増殖中のタンパク質の基底リン酸化レベル(Basal phosphorylation)も大きく変動する可能性があります。ゆえに 1 種類の細胞溶解液から複数のキットを用いてアッセイを行う時には、キット毎のアッセイ条件を最適化することによって、それぞれのキットの最大アッセイウィンドウを得ることができます。

Detection of various phosphoproteins in LNCAP cells

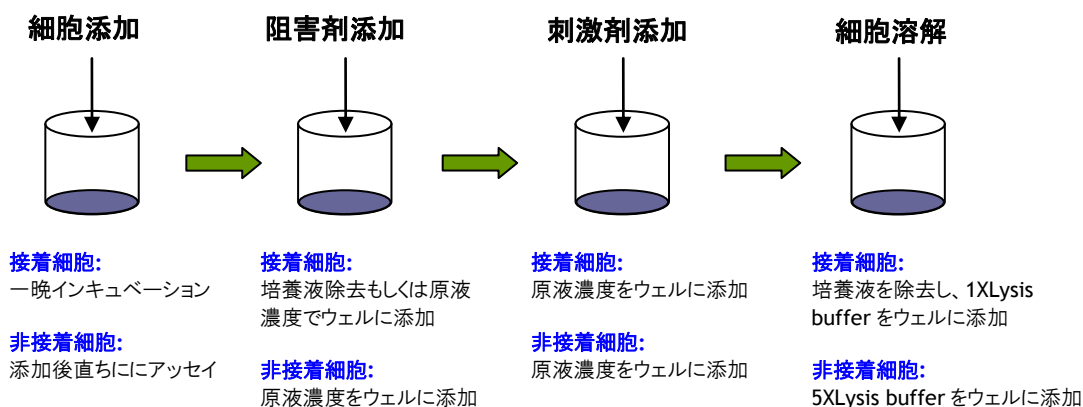


左図:
LNCAP 細胞を、96 well マイクロプレートに 25,000 cells/well で播種、培養液 RPMI (10 %FBS, グルタミン、ビルビン酸ナトリウム、ペニシリン/ストレプトマイシン含む) を使用し、37°C /5% CO₂ インキュベーターで培養を行った。翌朝、ウェル内の培養液を交換し、2 μM ワートマニンを添加(または不添加)後、3 時間インキュベーターした。その後、培養液中のビオチンを除去するため、氷冷 PBS で細胞を洗浄した。最後に、50 μL の 1xLysis buffer を加え 10 分間穏やかに攪拌した。各培養ウェルから 4 μL の細胞溶解液を ProxiPlate の 8 ウェルに移し 8 種類それぞれのリン酸化を解析した。8 種類の標的タンパク質のうち、5 種類が LNCAP 細胞の基底リン酸化レベル(Basal phosphorylation)に対し、有意なアッセイウィンドウを示した。

プロトコール

接着細胞と浮遊細胞

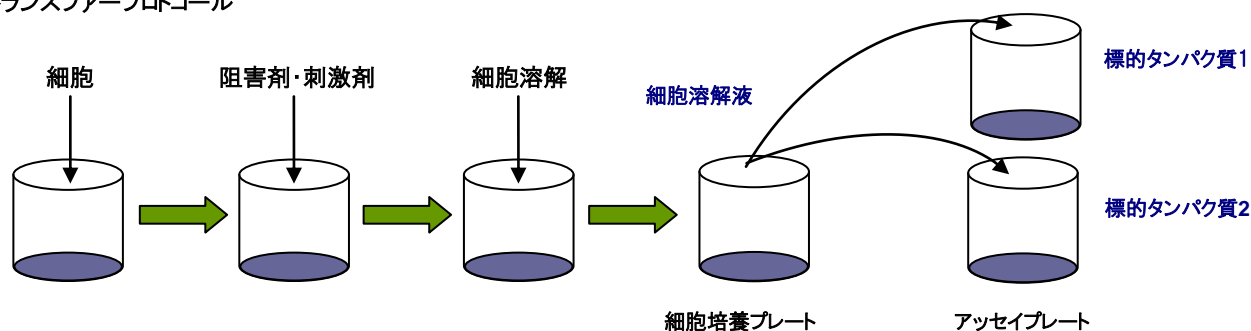
SureFire アッセイは、接着細胞、浮遊細胞どちらも使用することができます。いずれも、細胞の培養と細胞内シグナル伝達パスウェイの刺激あるいは阻害、それに続く細胞溶解液の調製(下図)と、この細胞溶解液を用いた標的リン酸化タンパク質の検出、に分かれます。



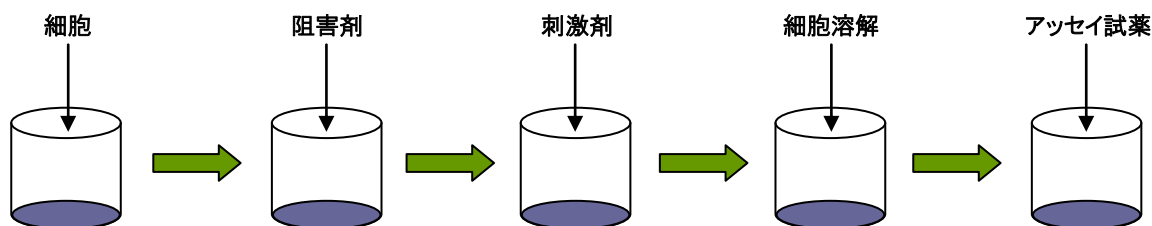
トランスファープロトコールとシングルウェルプロトコール

接着細胞を用いたアッセイには、トランスファープロトコールとシングルウェルプロトコールがあり、トランスファープロトコールが標準プロトコールです。トランスファープロトコールでは、細胞培養プレートで細胞を培養し、細胞を溶解後、培養プレートから別のプレートに細胞培養液の一部を移し換えてアッセイを行います。一方、シングルウェルプロトコールは、ハイスループト解析を目的としています。アッセイに使用するプレートと同じマイクロプレートにて、細胞を培養し、細胞溶解液を加えてアッセイを行います。

トランスファープロトコール



シングルウェルプロトコール



接着細胞を使用する時は、トランスファープロトコール、シングルウェルプロトコールどちらとも、細胞を溶解する前に培養液を除去します。これにより、細胞培養液中のアッセイに干渉する可能性のある因子を、除去することができます。干渉する薬剤は、抗体-標的タンパク質、抗体-ProteinA、ビオチン-ストレプトアビジンの反応を干渉するビオチンやビオチン様物質、AlphaScreen シグナルの発生に必要な一重項酸素を干渉する化合物などです。

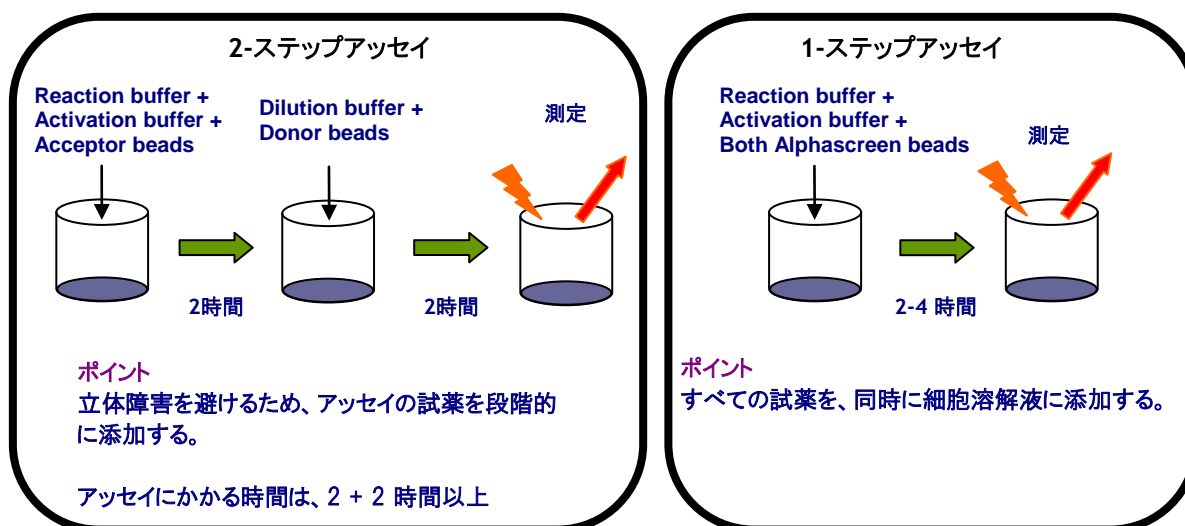
浮遊細胞では、シングルウェルプロトコールにてアッセイを行い、培養液を除去せず、直接 Lysis buffer を添加します。アッセイに干渉する因子が培養液に含まれると、シグナルを阻害する可能性があるため、あらかじめ無血清(低血清)培地を使用する、など干渉物質を含まない培養液で細胞を懸濁してください。

1 ステップ vs 2 ステップアッセイ

SureFire アッセイは、キットの種類によって、1 ステップアッセイ(細胞溶解液に同時に試薬を添加)と、2 ステップアッセイ(試薬を 2 段階で添加)のどちらかのプロトコールに従います。

2 ステップアッセイでは、添加する試薬が分けられるため、感度が向上します。また、抗体と標的タンパク質の複合体形成時における、立体障害の影響を受け難いプロトコールです。

HTS のため試薬の分注操作を最小限にとどめるには、2 ステップアッセイを 1 ステップアッセイに改変可能です。1 ステップアッセイにプロトコールを変更しても、インキュベーション時間を長くすることによって、2 ステップアッセイと比べた時のアッセイウィンドウの低下を軽減できることがあります。例えば、一晩のインキュベーションによって、広いアッセイウィンドウが得られたことがあります。



トランスファープロトコル(標準プロトコル;接着細胞を使用)

標準プロトコルでは、細胞培養プレートで細胞を培養し、細胞を溶解後、別のプレートに細胞培養液の一部を移し換え、アッセイを行います。AlphaPlate shallow well-384 (Cat.6008350)あるいは AlphaPlate -1536 (Cat.6004350)を使用します。

1 日目(細胞を播種し培養する)

細胞抽出液を調製するために、まず、プレートに播種する細胞数を検討します。通常、1 well あたり 10,000、20,000、40,000 細胞をプレートに播種し、最適な細胞数を検討します。このプロトコルでは、前述の条件に従います。

1. 細胞数をカウントした細胞培養液にフレッシュな培地を加え、200,000 cells/ mL (40,000 cells/ well に相当)に調製します。
2. 1 の細胞培養液 2 mL に培地 2 mL を加え、100,000 cells/ mL (20,000 cells/ well に相当)に調製します。
3. 2 の細胞培養液 2 mL に培地 2 mL を加え、50,000 cells/ mL (10,000 cells/ well に相当)に調製します。
4. 96-well プレート(透明底)に 200 μ L の細胞培養液を加えます。
5. CO₂ インキュベーターで、16-20 時間インキュベートします。

2 日目(アゴニスト刺激後、SureFire アッセイを行う)

1. 以下の試薬を調製します

- 1 X Lysis buffer

例)1,600 μ L の Milli Q 水に、400 μ L の 5 X Lysis buffer を加えます。

- 無血清培地

血清飢餓処理が必要な場合に使用します。あらかじめ 37°C に保温します。

- アゴニスト溶液

可能な限り無血清培地、あるいは HBSS などのバッファーを使用します。あらかじめインキュベーション温度に保温します。

1 ステップアッセイで使用

以下は例です。Pre mix 調製に使用する試薬量は、キット毎に異なりますので、付属のマニュアルを参照してください。

- AlphaScreen beads pre mix

Activation Buffer を、Reaction Buffer を使って 7 倍希釈します。

例)587 μ L の Reaction Buffer に、98 μ L の Activation Buffer、を加えます。

上の溶液量の 1/70 倍の AlphaScreen Acceptor beads と、1/140 倍の AlphaScreen Donor beads を混合します。調製は遮光条件下、室温で行い、同日中に使用してください。

例)685 μ L の Reaction Buffer + Activation Buffer に、10 μ L の AlphaScreen Acceptor beads と、5 μ L の AlphaScreen Donor beads を加えます。

ポイント

細胞播種密度は、通常 10,000-75,000 cells/ well の範囲から 3 点ほど選び、検討します。詳細は P16 アッセイの最適化をご参照ください。

インキュベーション時間は細胞種によって異なり、最低 15 分以上、必要によって 2 日間行い、最適な時間を決めます。

血清飢餓処理によって、バックグラウンドが低下することがあります。

培地中に、ピオチン(特に RPMI)、フェノールレッド、血清などのアッセイ阻害因子が含まれると、シグナルが低下することがあります。無血清培地・バッファーの使用が困難な場合は、アゴニスト刺激後、HBSS などで洗浄します。

Activation Buffer が白濁している場合は、37 °C に加温すると再溶解します。

蛍光灯の光が直射されない物陰であれば消灯は必要ありません。緑色フィルムを照明に貼ることも対応できます。

細胞株や標的タンパク質によって、至適ビーズ濃度が異なります。加えるビーズ量は 1/280 倍-1/70 倍の範囲で検討してください

2 ステップアッセイで使用

以下は例です。Pre mix 調製に使用する試薬量は、キット毎に異なりますので、付属のマニュアルを参照してください。

■ AlphaScreen Acceptor beads pre mix

Activation Buffer を、Reaction Buffer を使って 5 倍希釈します。
例) 392 μL の Reaction Buffer に、98 μL の Activation Buffer、
を加えます。

上の溶液量の 1/50 倍の AlphaScreen Acceptor beads を混合します。調製は室温で行い、同日中に使用してください。

例) 490 μL の Reaction Buffer + Activation Buffer に、10 μL の
AlphaScreen Acceptor beads を加えます。

■ AlphaScreen Donor beads pre mix

AlphaScreen Donor beads を Dilution Buffer を使って、20 倍希釈します。調製は遮光条件下、室温で行い、同日中に使用してください。

例) 190 μL の Dilution Buffer に、10 μL の AlphaScreen Donor
beads を混合します。

2. 培地を除き、無血清培地を加えます。
3. CO₂ インキュベーターで、2 時間～一晩インキュベートし、血清飢餓処理を行います。
細胞種やシグナル伝達系によって、血清飢餓処理が必要な場合がありますので、必要性和インキュベーション時間を検討してください。
4. 培地を除き、50 μL のアゴニスト溶液を加えます。アゴニスト濃度は、まず EC100 濃度から条件を検討してください。細胞播種密度、細胞培養時間が決定されてから、アゴニスト応答反応曲線を作製することをお勧めします。
5. 室温、あるいは 37°C にて 5-20 分間インキュベーションし、細胞を刺激します。
6. 培地を除き、100 μL の 1 X Lysis buffer を加えます。
7. シェーカーに載せ、室温にて 10 分間穏やかに攪拌し、細胞を溶解させます。
8. 溶解された細胞を、適切な倍率で顕微鏡観察します。
SureFire の Lysis buffer は、マイルドに細胞を溶解し、ゲノム DNA のコンタミネーションを防ぐため、核は溶解されません。
核内タンパク質を検出する場合、Activation Buffer を 1 X Lysis buffer を使って 10 倍希釈した Lysis buffer を使用するとシグナルが改善される可能性があります。詳細は P19 アッセイの最適化「細胞の溶解」をご覧ください。
細胞溶解液は -20°C 以下にて凍結保存できます。
9. 4 μL の 6 で調製した細胞溶解液、あるいはコントロール溶解液 (SureFire キット付属)、AlphaPlate shallow well-384 (Cat.6008350) に移します。

Activation Buffer が白濁している場合は、37 °C に加温すると再溶解します。

細胞株や標的タンパク質によって、至適ビーズ濃度が異なります。加えるビーズ量は 1/200 倍-1/50 倍の範囲で検討してください

蛍光灯の光が直射されない物陰であれば消灯は必要ありません。
緑色フィルムを照明に貼ることも対応できます。

細胞株や標的タンパク質によって、至適ビーズ濃度が異なります。加えるビーズ量は 1/10 倍-1/40 倍の範囲で検討してください

血清飢餓処理が必要ない場合は行いません。

培地中にアッセイ阻害因子が含まれる場合、HBSS などで洗浄後、Lysis buffer を加えます。

シグナルが低い場合、加える Lysis buffer 量を 25-50 μL にします。攪拌が不十分だとばらつくことがあります。

プレートを観察すると、細胞骨格、核が残っている様子が確認されますが、細胞内の水溶性分子は遊離し、Lysis buffer に溶解しています。

核内タンパク質であっても、まずは通常の Lysis buffer を用いて評価を行ってください。

細胞溶解液の凍結融解は避けてください。

1 ステップアッセイ

10. 7 μ L の AlphaScreen beads pre mix を加えます。試薬の添加は遮光下で行ってください。
11. TopSeal-A (Cat. 6050195) を貼り、遮光条件下、室温 (22°C) で 2 時間インキュベーションします。
12. Alpha 専用プレートリーダーで測定します。

2 ステップアッセイ

10. 5 μ L の AlphaScreen Acceptor beads pre mix を加えます。試薬の添加は遮光下で行ってください。
11. TopSeal-A (Cat. 6050195) を貼り、遮光条件下、室温 (22°C) で 2 時間インキュベーションします。
12. 2 μ L の AlphaScreen Donor beads pre mix を加えます。試薬の添加は遮光下で行ってください。
13. TopSeal-A (Cat. 6050195) を貼り、遮光条件下、室温 (22°C) で 2 時間インキュベーションします。
14. Alpha 専用プレートリーダーで測定します。

気泡を避けるため、ピペティングによる混合は行わないでください。気になる場合はプレートシェーカーで 2 分程攪拌した後インキュベーションします。

アルミホイルなどでプレートを遮光します。

シングルウェルプロトコール(接着細胞を使用)

少量でアッセイを行うため、ハイスループット解析を目的としています。アッセイに使用するプレートと同じマイクロプレート内にて、細胞を培養します。AlphaPlate shallow well-384 (Cat.6008350)あるいはAlphaPlate -1536 (Cat.6004350)を使用します。

1 日目(細胞を播種し培養する)

トランスファープロトコールと同様、プレートに播種する細胞数を検討します。通常、1 well あたり 2,000 以上の細胞をプレートに播種し、最適な細胞数を検討します。このプロトコールでは、2,000 cells/ well の場合です。

1. 細胞数をカウントした細胞培養液にフレッシュな培地を加え、100,000 cells/ mL (2,000 cells/ well に相当)に調製します。
2. AlphaPlate shallow well-384 に 20 μ L の細胞培養液を加えます。
3. CO₂ インキュベーターで、16-20 時間インキュベートします。

2 日目(アゴニスト刺激後、SureFire アッセイを行う)

1. 以下の試薬を調製します

- 1 X Lysis buffer

例) 1,600 μ L の Milli Q 水に、400 μ L の 5 X Lysis buffer を加えます。

- アゴニスト溶液・化合物溶液

可能な限り無血清培地、あるいは HBSS などのバッファーを使用します。あらかじめインキュベーション温度に保温します。

1 ステップアッセイで使用

以下は例です。Pre mix 調製に使用する試薬量は、キット毎に異なりますので、付属のマニュアルを参照してください。

- AlphaScreen beads pre mix

Activation Buffer を、Reaction Buffer を使って 7 倍希釈します。

例) 587 μ L の Reaction Buffer に、98 μ L の Activation Buffer、を加えます。

上の溶液量の 1/70 倍の AlphaScreen Acceptor beads と、1/140 倍の AlphaScreen Donor beads を混合します。調製は遮光条件下、室温で行い、同日中に使用してください。

例) 685 μ L の Reaction Buffer + Activation Buffer に、10 μ L の AlphaScreen Acceptor beads と、5 μ L の AlphaScreen Donor beads を加えます。

2 ステップアッセイで使用

以下は例です。Pre mix 調製に使用する試薬量は、キット毎に異なりますので、付属のマニュアルを参照してください。

- AlphaScreen Acceptor beads pre mix

Activation Buffer を、Reaction Buffer を使って 5 倍希釈します。

例) 392 μ L の Reaction Buffer に、98 μ L の Activation Buffer、を加えます。

ポイント

トランスファーウェルプロトコールをご参照ください。以下はシングルウェルプロトコールにおけるポイントです。

血清飢餓処理が必要な場合は、培養後行ってください。方法はトランスファープロトコールに従います。

上の溶液量の 1/50 倍の AlphaScreen Acceptor beads を混合します。調製は室温で行い、同日中に使用してください。

例)490 μL の Reaction Buffer + Activation Buffer に、10 μL の AlphaScreen Acceptor beads を加えます。

■ AlphaScreen Donor beads pre mix

AlphaScreen Donor beads を Dilution Buffer を使って、20 倍希釈します。調製は遮光条件下、室温で行い、同日中に使用してください。

例)190 μL の Dilution Buffer に、10 μL の AlphaScreen Donor beads を混合します。

2. 20 μL ある培養液のうち、10 μL だけ除きます。
3. 10 μL のアゴニスト溶液を加えます。
化合物スクリーニングでは、まず 5 μL の化合物を加えた後、5 μL のアゴニスト溶液を加えます。
4. 室温、あるいは 37°C にて 5-20 分間インキュベーションし、細胞を刺激します。
5. 培地を除き、4 μL の 1 X Lysis buffer を加えます。
6. シェーカーに載せ、室温にて 10 分間穏やかに攪拌し、細胞を溶解させます。

1 ステップアッセイ

7. 7 μL の AlphaScreen beads pre mix を加えます。試薬の添加は遮光下で行ってください。
8. TopSeal-A (Cat. 6050195) を貼り、遮光条件下、室温 (22°C) で 2 時間インキュベーションします。
9. Alpha 専用プレートリーダーで測定します。

2 ステップアッセイ

7. 5 μL の AlphaScreen Acceptor beads pre mix を加えます。試薬の添加は遮光下で行ってください。
8. TopSeal-A (Cat. 6050195) を貼り、遮光条件下、室温 (22°C) で 2 時間インキュベーションします。
9. 2 μL の AlphaScreen Donor beads pre mix を加えます。試薬の添加は遮光下で行ってください。
10. TopSeal-A (Cat. 6050195) を貼り、遮光条件下、室温 (22°C) で 2 時間インキュベーションします。
11. Alpha 専用プレートリーダーで測定します。

チップの先がプレート底面に触れないように注意します。アスピレーターを、1-2 μL /秒以下にします。

アゴニスト濃度は、まず EC100 濃度から条件を検討してください。細胞播種密度、細胞培養時間が決定されてから、アゴニスト応答反応曲線を作製します。

Lysis buffer 量が少ないため、ばらつきの抑制に必ず攪拌してください。推奨スピードは、350 rpm です。

浮遊細胞を用いたプロトコール

このプロトコールのアッセイボリュームは、分注機を使用したハイスルーブット解析を対象にしています。アッセイボリュームを増やすことによって、マニュアルでのアッセイも行うことができます。プレートには、AlphaPlate -384 (Cat.6005350)あるいは AlphaPlate -1536 (Cat.6004350)を使用します。

細胞の播種

接着細胞のプロトコールと同様、プレートに播種する細胞数を検討します。通常、1 well あたり 2,000 以上の細胞をプレートに播種し、最適な細胞数を検討します。このプロトコールでは、5,000 cells/ well の場合です。

1. 回収した細胞にフレッシュな無血清培地、あるいは HBSS を加え、1,000,000 cells/ mL (5,000 cells/ well に相当) に調製します。
2. AlphaPlate -384 に 5 μ L の細胞培養液を加えます。
3. CO₂ インキュベーターで、1-2 時間インキュベートします。

アゴニスト刺激後、SureFire アッセイを行う

4. 以下の試薬を調製します

- アゴニスト溶液・化合物溶液
無血清培地、あるいは HBSS などのバッファーを使用します。あらかじめインキュベーション温度に保温します。

1 ステップアッセイで使用

以下は例です。Pre mix 調製に使用する試薬量は、キット毎に異なりますので、付属のマニュアルを参照してください。

- AlphaScreen beads pre mix
Activation Buffer を、Reaction Buffer を使って 7 倍希釈します。
例) 587 μ L の Reaction Buffer に、98 μ L の Activation Buffer、
を加えます。
上の溶液量の 1/70 倍の AlphaScreen Acceptor beads と、
1/140 倍の AlphaScreen Donor beads を混合します。調製は遮光条件下、室温で行い、同日中に使用してください。
例) 685 μ L の Reaction Buffer + Activation Buffer に、10 μ L の
AlphaScreen Acceptor beads と、5 μ L の AlphaScreen
Donor beads を加えます。

2 ステップアッセイで使用

以下は例です。Pre mix 調製に使用する試薬量は、キット毎に異なりますので、付属のマニュアルを参照してください。

- AlphaScreen Acceptor beads pre mix
Activation Buffer を、Reaction Buffer を使って 5 倍希釈します。
例) 392 μ L の Reaction Buffer に、98 μ L の Activation Buffer、
を加えます。
上の溶液量の 1/50 倍の AlphaScreen Acceptor beads を混合します。調製は室温で行い、同日中に使用してください。

ポイント

接着細胞のプロトコールをご参照ください。
以下は浮遊細胞を用いたプロトコールにおけるポイントです。

培地中に、ビオチン(特に RPMI)、フェノールレッド、血清などのアッセイ阻害因子が含まれると、シグナルが低下することがあります。
接着細胞のプロトコールとは異なり、アッセイに培地成分が残りますので、血清・ビオチンフリーの培地・バッファーをご使用ください。

例)490 μL の Reaction Buffer + Activation Buffer に、10 μL の AlphaScreen Acceptor beads を加えます。

■ AlphaScreen Donor beads pre mix

AlphaScreen Donor beads を Dilution Buffer を使って、20 倍希釈します。調製は遮光条件下、室温で行い、同日中に使用してください。

例)190 μL の Dilution Buffer に、10 μL の AlphaScreen Donor beads を混合します。

5. 2.5 μL の化合物溶液、あるいは無血清培地 / HBSS を加えます。
6. 2.5 μL のアゴニスト溶液を加えます。
7. 室温、あるいは 37°C にて 5-20 分間インキュベーションし、細胞を刺激します。
8. 2.5 μL の 5 X Lysis buffer を加えます。
9. シェーカーに載せ、室温にて 10 分間穏やかに攪拌し、細胞を溶解させます。

1 ステップアッセイ

10. 12 μL の AlphaScreen beads pre mix を加えます。試薬の添加は遮光下で行ってください。
11. TopSeal-A (Cat. 6050195) を貼り、遮光条件下、室温 (22°C) で 2 時間インキュベーションします。
12. Alpha 専用プレートリーダーで測定します。

2 ステップアッセイ

10. 8.5 μL の AlphaScreen Acceptor beads pre mix を加えます。試薬の添加は遮光下で行ってください。
11. TopSeal-A (Cat. 6050195) を貼り、遮光条件下、室温 (22°C) で 2 時間インキュベーションします。
12. 3.5 μL の AlphaScreen Donor beads pre mix を加えます。試薬の添加は遮光下で行ってください。
13. TopSeal-A (Cat. 6050195) を貼り、遮光条件下、室温 (22°C) で 2 時間インキュベーションします。
14. Alpha 専用プレートリーダーで測定します。

アゴニスト濃度は、まず EC100 濃度から条件を検討してください。細胞播種密度が決定されてから、アゴニスト応答反応曲線を作製します。

1x Lysis buffer を調製せず、直接 5xLysis buffer を加えます。

Lysis buffer 量が少ないため、ばらつきの抑制に必ず攪拌してください。推奨スピードは、350 rpm です。

気泡を避けるため、ピペティングによる混合は行わないでください。気になる場合はプレートシェーカーで 2 分程攪拌した後インキュベーションします。

アッセイの最適化

アッセイのパフォーマンスを最大限に得るために、下記の実験条件を最適化します。

期待通りのアッセイのパフォーマンスが得られないときは、ウェスタンブロット法にて細胞やアッセイに問題がないか確認することをお勧めします。ウェスタンブロットでは検出されたにもかかわらず、SureFire アッセイで検出されなければ、アッセイの手順やキットの内容物に問題がある可能性があります。

アッセイフォーマットの選択

接着細胞を用いる場合には、96-well プレートに培養した細胞を使用するトランスファープロトコルを、浮遊細胞では、384-well シングルウェルプレートアッセイをお勧めします。

細胞播種密度

細胞数は、アッセイウィンドウに大きく影響し、1 ウェルあたりの細胞数は、多すぎても少なすぎてもシグナルが低下します。アッセイに必要な量と、細胞培養の維持に必要な量のバランスに注意します。通常、接着細胞では、96-well プレートに播種する細胞を、10,000-75,000 の範囲で一晩培養し、最適な細胞数を決定します。

細胞培養条件

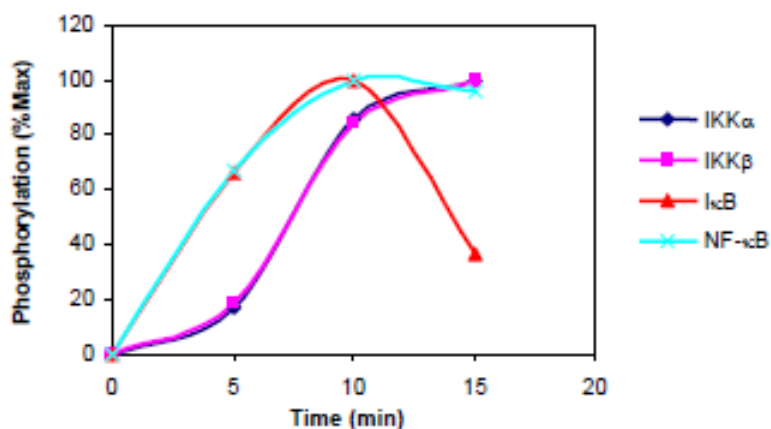
細胞培養の各ステップの最適化は、標的タンパク質ごとに条件が異なってくるため、非常に重要です。たとえばリン酸化 ERK の検出では、接着細胞は 15 時間以上(一晩)血清を含む培養液中で培養する必要があります。細胞が無血清培養液中で培養されたり、培養時間が短いと、シグナルは激減します。特に、シングルプロトコルにおいて、播種する細胞数のばらつきが原因で生じるエッジ効果や、細胞凝集などに起因するシグナルのばらつきに大きく影響します。

バックグラウンドを下げるために、細胞株や標的タンパク質によって、アッセイ前に血清飢餓処理を行うと有効なことがあります。通常 2-3 時間の無血清(あるいは低血清)培養液中のインキュベーションから始め、一晩インキュベーションを行うと有効な時もあります。

刺激時間

正常な増殖細胞では、多くのシグナルパスウェイは活性化されていない、あるいは活性化されていたとしても、低いレベルです。このようなパスウェイに対して、アゴニストは細胞を刺激し、受容体を介したリン酸化カスケードを誘導します。カスケード内のタンパク質のリン酸化レベルが最大に達する時間は、標的タンパク質毎に異なることがあり、短時間で一過的であったり、持続的に誘導される場合があります(下図)。ゆえに、細胞の刺激時間のタイムコースを測定する必要があります。この時間は、アッセイの温度(室温、または 37°C)に影響を受けます。

Timecourse of NF- κ B pathway activation in Hela cells



左図:

Hela 細胞を 96-well マイクロプレートに 100,000 cells/well で播種、MEM 培養液(10%FBS, ピルビン酸ナトリウム, 非必須アミノ酸, ペニシリン/ストレプトマイシンを含む)中で 37°C/5% CO₂ でインキュベーションした。翌朝、TNF α で細胞を刺激し、50 μ l の Lysis Buffer を、各々の時間で添加、細胞を溶解後、NF κ B パスウェイ活性に関与する異なるキナーゼのアッセイを行った。この実験から、解析されたリン酸化タンパク質の応答時間が異なることが分かります。

アッセイバッファーと DMSO 耐性

SureFire アッセイでは、ほとんどの細胞培養液を使用可能ですが、例外として、RPMI などのビオチンを含む培養液は、ビオチンがビオチン抗体-ストレプトアビジンの反応を干渉するため感度が低下します。RPMI が必須である場合は、アッセイ時に他の培養液へ置換してください。RPMI 中で培養した浮遊細胞を用いる場合は、細胞を回収しアッセイ用として HBSS か RPMI 以外の培養液に懸濁してください。接着細胞を用いる場合は、細胞を溶解する前に、全ての培養液を除去するため、影響は少ないと考えられます。

細胞培養に使用され、アッセイに干渉する物質

ビオチン(RPMI などに含まれます。)	ビオチン化抗体とストレプトアビジンドナービーズの結合を阻害します
血清	抗体と Protein A アクセプタービーズとの結合を阻害し、AlphaScreen シグナルに干渉します。
SDS	低濃度でもストレプトアビジンなどを変性させます。
フェノールレッド	AlphaScreen シグナルに干渉します。
抗体	抗体と Protein A アクセプタービーズとの結合を阻害します。

DMSO 溶解された化合物を使用する場合、DMSO は通常、刺激バッファー中に 1%未満の濃度で含まれます。細胞は、自身を DMSO 耐性へと変化させることができるため、細胞内シグナル伝達の DMSO 耐性も検討する必要があります。例えば、CHO 細胞における GPCR を介したカルシウムシグナルは、1% DMSO に対して耐性を示しますが、同細胞におけるリン酸化 ERK シグナルの DMSO 耐性濃度は、約 0.5%以下です。

細胞の溶解

細胞溶解液の調製は、アッセイのばらつきとシグナルウィンドウに影響する最も重要なポイントです。Lysis buffer には、界面活性剤とホスファターゼ阻害剤が含まれ、ゲノム DNA を遊離させることなく細胞を溶解させます。溶解後のプレートを観察すると、細胞骨格、核が残っていますが、細胞内の水溶性分子は遊離しています。プレートを撈拌すると(推奨速度 350 rpm)、撈拌しない時よりばらつきが低減することが確認されています。

核内タンパク質を検出するには、1 X Lysis buffer (9 parts)と、Activation Buffer (1 parts)を混合した Lysis buffer を用いるとシグナルが改善される可能性があります。この時クロマチンが遊離し、溶解液の粘性が増すため、ハンドリングは難しくなります。

! 上記にて調製した Lysis buffer を使用する時は、beads pre mix の調製時に Activation buffer を添加せず、Reaction buffer と AlphaScreen beads のみで調製して使用してください。

SureFire Lysis buffer は、幅広い細胞株に使用できますが、細胞株によっては、プロテアーゼ阻害剤や更に界面活性剤の添加が必要です。この時、添加した試薬が、アッセイに干渉しないことを確認します。通常、96-well プレートでは、100 μ L の Lysis buffer を加えますが、良好なシグナルが得られない場合、25 あるいは 50 μ L に減らすことによって、改善する可能性があります。

AlphaScreen beads 濃度

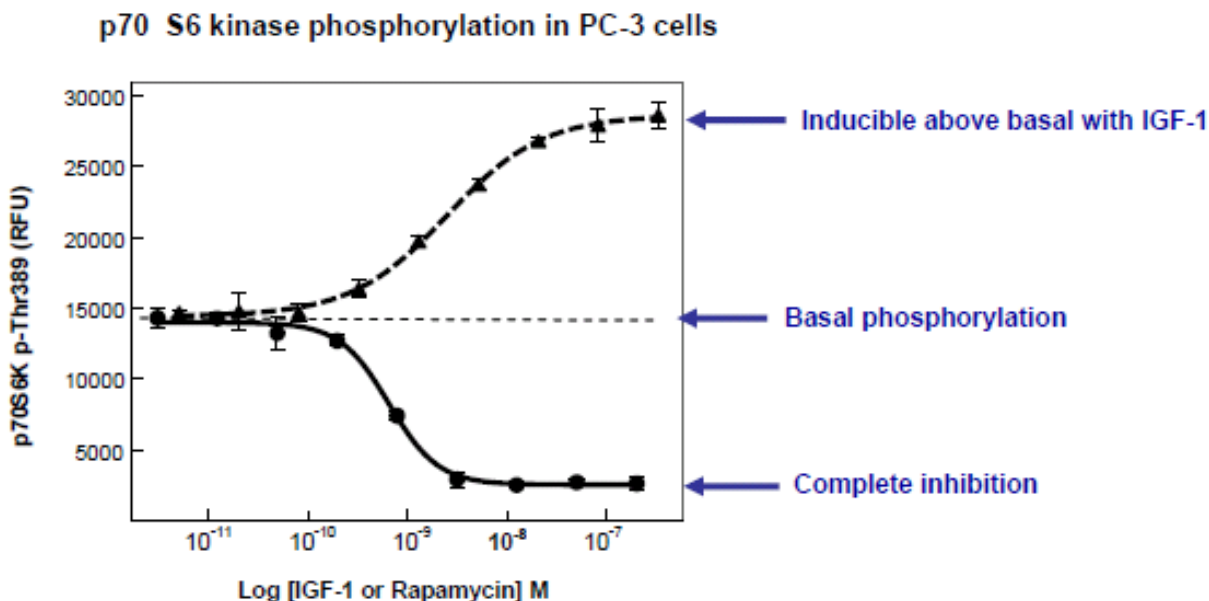
細胞株や標的タンパク質によって条件が異なり、最大アッセイウィンドウを得るために最も重要なポイントです。それぞれのビーズの終濃度は、通常 44 μ g/ mL ですが、1/2 濃度の時に、最大のシグナルウィンドウが得られることがあります。終濃度 11-44 μ g/ mL の範囲で至適濃度を検討します。

インキュベーション時間

2 ステップアッセイでは、アクセプタービーズを添加し 2 時間インキュベーション後、ドナービーズを添加してさらに 2 時間インキュベーションを行います。このドナービーズを添加した後のインキュベーション時間を、2 時間から一晩まで行うことができます。通常、2 時間で十分ですが、ドナービーズ添加後 4 時間インキュベーションすることによって、シグナルウィンドウが改善される場合があります。

最大アッセイウィンドウと基底リン酸化レベル

シグナル伝達パスウェイが静止状態の細胞では、最大シグナルウィンドウは、播種する細胞数、細胞溶解液の濃度、アッセイ前の血清飢餓処理のような培養テクニックの影響を受けます。しかし、高い基底リン酸化レベルを多くの細胞で示すパスウェイもあります。例えば、癌細胞における脱制御された PI-3 キナーゼパスウェイは、血清飢餓や接触阻害処理を施してもリン酸化レベルが低下しません。このような特殊な細胞株の場合、パスウェイ阻害剤を用いることによって、アッセイウィンドウをより改善することが可能です。阻害剤は、刺激していないコントロール細胞よりも低いレベルまでシグナルを低下させます。



上図:

PC-3 細胞を、96-well プレートに 50,000cells/ well で播種、F12 Kaighn's 培養液(10%FBS, ビルビン酸ナトリウム, ペニシリン/ストレプトマイシン含む) 中で、37°C/5% CO₂ でインキュベートした。翌朝、一方の細胞は 2 時間血清飢餓処理後 IGF-1 で 30 分刺激し、もう一方は任意の濃度のラパマイシンで 2 時間処理した。いずれの細胞も 25µl の Lysis Buffer で溶解後、p70S6 キナーゼのリン酸化(Thr389)アッセイを行った。これら条件下で、p70S6(Thr389)キナーゼの基底リン酸化レベルは約 5 倍のシグナルウィンドウを示し、また、IGF-1 のような特異的なアゴニストを使った、受容体を介したパスウェイの活性化はおおよそ 2 倍のウィンドウを示した。

トラブルシューティング

カウントが低い

- AlphaScreen ドナービーズを扱う全てのステップが、光量を抑えた環境で行われているか確認してください。持続的に強い光に曝されると AlphaScreen ドナービーズは劣化します。ビーズを扱う全てのステップは緑色フィルム、もしくは弱い光の下で行ってください。
- 使用しているプレートが浅底(shallow well),白,不透明 384 ウェルプレートであることを確認してください。アッセイの総量が少量(11µl)である場合、一般的な 384 ウェルプレートでは問題があることがあります。
- インキュベーション温度が 22°Cであることを確認してください。温度は抗体の結合や AlphaScreen のパフォーマンスに大きく影響します。
- バッファーが適切に調製されているか確認してください。特に 5X Lysis buffer は使用前に 1X Lysis buffer に希釈し(接着細胞;トランスファーアッセイ時)、Activation buffer は完全に溶解していることを確認してください。
- AlphaScreen ビーズが適切な量で使用されているか確認してください。
- 細胞密度が適切であるか確認してください。細胞数が過剰・過少であると、細胞内シグナル伝達パスウェイの活性に影響します。
- 細胞の継代回数が多すぎないこと、細胞が反応性を失っていないことを確認してください。
- ウェスタンブロットによる解析はキットのパフォーマンス確認に有効です。ウェスタンブロットによって標的タンパク質のバンドが検出されれば、SureFire アッセイでもシグナルが検出されるはずですが。

バックグラウンドが高い

- 細胞密度が適切であるか確認してください。細胞数が過剰・過少であると、標的タンパク質の基底リン酸化レベルに影響します。
- 細胞の継代回数が多すぎないこと、細胞の挙動が期待される状態であることを確認してください。
- 血清によって活性化されるキナーゼパスウェイに標的タンパク質が含まれ、血清以外の刺激剤を使用する時は、刺激バッファーに血清が含まれていないことを確認してください。
- パスウェイによっては、リン酸化基底レベルが高い、または恒常的な活性化が起きていることがあります。このようなパスウェイ内の標的タンパク質のに対して、高いアッセイウィンドウを得たい場合、パスウェイ上流の阻害剤が有効なことがあります。
- AlphaScreen ビーズが適切な条件下にあり、保存され、正しく取り扱われているか確認してください。

感度が不十分

- AlphaScreen ビーズの使用量を確認してください。
- 使用前に Activation buffer が溶解されていることを確認してください。
- 細胞の継代回数が多すぎないこと、細胞が反応性を失っていないことを確認してください。
- インキュベーション温度が 22°Cであることを確認してください。温度は抗体の結合や AlphaScreen ビーズシグナルのパフォーマンスに大きく影響します。
- より高濃度の細胞溶解液を作るため、Lysis buffer の量を減らしてください。溶解液量を少量にする程、細胞溶解液の最終濃度は高くなります。
- シングルウェルプロトコルを使用してください。トランスファープロトコルはプレートに培養した細胞の一部だけを使います。一方、シングルウェルプロトコルはウェル内の全細胞を使用します。
- ウェスタンブロットによる解析はキットのパフォーマンス確認に有効です。ウェスタンブロットによって標的タンパク質のバンドが検出されれば、SureFire アッセイでもシグナルが検出されるはずですが。

細胞が十分刺激されていない

- 細胞がコンフルエントであることを確認してください。コンフルエントである場合、シグナル伝達パスウェイ(特に MAPK や PI3K のような増殖に関連するパスウェイ)の多くは、静止状態になり同調します。アゴニストが静止状態の細胞に導入されると均一に応答します。
- 細胞密度が適切であるか確認してください。細胞数が過剰・過少であると、標的タンパク質の基底リン酸化レベルに影響します。細胞密度、すなわち標的リン酸化タンパク質の量がアッセイレンジに入るようにしてください。
- 細胞の継代回数が多すぎないこと、細胞が反応性を失っていないことを確認してください。
- 細胞の回収条件を確認し、回収後も細胞の生存率が良いことを確認してください。通常、70-90%コンフルエントの、対数増殖期にある状態の細胞を回収します。
- 標的キナーゼパスウェイが活性化されていること、あるいは使用するアゴニストによって活性化されることを確認してください。これは細胞株によって変わることがあります。
- 刺激剤/アゴニストが分解していないことを確認ください。アッセイ前に新しく調製してください。必要であれば BSA などのキャリアタンパク質を使用してください。

日間差

- 細胞の回収条件を確認し、培養・回収の標準的なプロトコールを使用してください。
- 室温の変化を確認してください。
- 明るい光源に曝されていないか確認してください。
- 刺激時間とアッセイのインキュベーション時間の変化を確認してください。
- アッセイプレート 1 枚ごとに、ポジティブ・ネガティブコントロールを使用すると、プレート間のアッセイのばらつきに対して、有効なコントロールとなります。

FAQ

1. どんな種類の細胞がアッセイに使用できますか？

形質転換細胞や初代培養細胞など、多くの接着・浮遊細胞を使用できます。ただし、標的タンパク質の発現やリン酸化の条件は細胞によってそれぞれ異なるため、刺激時間や細胞数のなどの条件はそれぞれの細胞で最適化する必要があります。

2. どの位の濃度の細胞溶解液が必要ですか？

アッセイは細胞内在レベルの標的タンパク質発現量に対して最適化され、通常、細胞溶解液の濃度は、0.2-0.5 mg/mL の範囲です。ウエスタンブロット法で標的タンパク質のバンドが観察できれば、SureFire アッセイでもシグナルが検出されます。標的タンパク質の発現量が低い細胞、例えば、ウエスタンブロットでバンドを検出するために免疫沈降を行う場合などは、アッセイの検出限界を超えている可能性があります。

3. 安定発現細胞株、または一過的に形質転換したキナーゼ/受容体発現株は使用できますか？

安定発現細胞株、一過性発現細胞株、共にリン酸化反応をよく誘発することが示されています。再現良くアッセイを行うためには、安定発現細胞株の使用をお勧めします。特に、標的タンパク質を高発現させた安定発現細胞株では強いシグナルが得られます。ただし、過剰発現させる時には、標的タンパク質量がアッセイレンジ内に収まるように、細胞溶解液の濃度を最適化する必要があります。

4. 細胞はどのように扱えばよいですか？

細胞は、70-90%コンフルエントで回収しマイクロプレートに播種します。フラスコから穏やかな条件で細胞を剥離し、計数後、新しい培養液で適切な密度に希釈してください。また、接着細胞を用いる場合、アッセイ前に少なくとも16時間以上プレートで培養してください。接着細胞は、回収後シグナル伝達の機能を回復するのに時間が必要なことがあります。

5. アッセイの最適化に必要なパラメーターは何ですか？

再現性の良い安定的なパフォーマンスを確保するためには、様々な実験条件を最適化する必要があります。これらの条件には、細胞の播種密度や培養条件、細胞が血清飢餓を必要とするか、アゴニスト刺激時間のタイムコースなどが含まれます。実験条件の最適化については、P16をご覧ください。

6. アッセイスケールを変えることは可能ですか？

標準的な SureFire アッセイでは、384-well マイクロプレートを使用し、1 アッセイ当たり、4 μ lの細胞溶解液、7 μ lのアッセイ試薬を使用、総量 11 μ lのアッセイです。1536-well マイクロプレートを用いて総量 4-5 μ lにスケールダウンし、細胞溶解液とアッセイ試薬を節約したプロトコルもあります。アッセイをスケールアップすることも可能ですが、試薬の使用量が過剰なためお勧めしません。

7. なぜ特定のアッセイプロトコルを選択するのですか？

トランスファーアッセイプロトコルでは、通常 96-well あるいは 384-well で培養した細胞を、刺激/抑制し、細胞溶解液を調製後、アッセイプレートに移します。このプロトコルは、アッセイの開発や最適化、低・中スループットアッセイ、1ウェルで培養した細胞から複数のタンパク質を解析するときなどに有効です。シングルプレートプロトコルは、通常、ハイスループットアッセイ、各ウェルでそれぞれ1種類のための標的タンパク質を解析する、試薬を最小量にする、分注機が必須である際に利用します。

8. 一つの細胞溶解液から複数の標的タンパク質を検出できますか？

SureFire アッセイでは、非常に少量の細胞溶解液を使用します。細胞培養液は、96-well あるいは 384-well マイクロプレートで、1ウェル当たり20-100 μ lの Lysis buffer によって調製されますが、アッセイでは、1ウェル当たり4 μ lの細胞溶解液しか使用しません。従って、一度細胞溶解液を調製すると、複数の標的タンパク質に対してアッセイを行うことができます。このとき、複数ある標的リン酸化タンパク質が一過的吗、発現量に制約があるかは、細胞株によって変化する可能性があります。

9. 特異性はどうなっていますか？

全ての SureFire アッセイキットはヒト由来のタンパク質と反応します。SureFire キットがターゲットとするタンパク質は、種間の保存性が高く、殆どのキットは、マウスやラット由来のタンパク質の検出に使用できます。その他の種については、個別に試す必要があります。交差性は、キット毎に付属のマニュアルに記載されています。

10. オーバーナイトでインキュベーションすることはできますか？

室温でアッセイを行った場合、2-4 時間後に抗体の結合はほぼ平衡状態に達します。一度平衡状態に達するとインキュベーション時間を長くしても問題はなく、使用上の利便性に従って、室温で一晩インキュベート可能です。

11. データ解析のためにバックグラウンド値を引き算しても良いですか？

データ解析において、ポジティブなシグナルから、バッファーだけのバックグラウンドを引き算することはお勧めしません。ELISA のような方法では、複数回の洗浄ステップで細胞の細片や干渉物質が除去されるため、バッファーのみのバックグラウンドを引き算することができます。しかし、SureFire はホモジニアスのアッセイであるため、タンパク質・脂質・核酸・その他細胞の細片を含んだクルードな細胞溶解液を測定します。従って、このアッセイシステムの最も適切なバックグラウンド(ネガティブコントロール)は、標的タンパク質がリン酸化されていない細胞溶解液となります。ネガティブコントロールとなる細胞溶解液は通常、キナーゼ阻害剤を使用しているか、シグナル伝達パスウェイを刺激していない細胞から調製されています。



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