

(90 × 210mm Size)

**FUJIFILM**

**Wako**

291-77401 ( 1,000 tests)  
297-77403 (10,000 tests)

## Fluorospark™ Kinase/ADP Multi-Assay Kit

### [Introduction]

Phosphorylation and dephosphorylation of proteins in signal transduction play a critical role in physiological regulation as immune response, oncogenesis, differentiation, apoptosis and cell proliferation.

Kinases, which is the enzyme catalyze the phosphorylation of proteins, lipids and other molecules, is closely related to the variety of the diseases including a cancer and to be a main drug discovery target today.

“Fluorospark™ Kinase/ADP Multi-Assay Kit” is a simple and highly sensitive ADP quantitation kit through by enzymatic coupling reaction. The generated ADP through kinase reaction has been quantified as red fluorescent “Resorufin”. By the quantification of Resorufin, this kit can easily quantify the kinase activity with high sensitivity. Furthermore the accuracy of the measured value is higher than previous bioluminescent methods. This kit can utilize for both the endpoint assay and the real-time assay.

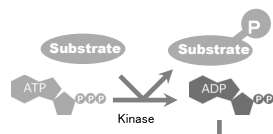
### [Features]

- High sensitive assay for kinase activity by quantification of the ADP amount as red fluorescent “Resorufin”.
- Fine linearity until 30 μmol/L ADP.
- Measurement of kinase activity after 30 minutes reaction [Endpoint assay].
- Measurement of kinase activity continuously [Real-time assay].
- Measurement of the wide range of kinases.
- High reliability (Excellent Z'-factor\* at low substrate conversion rate).

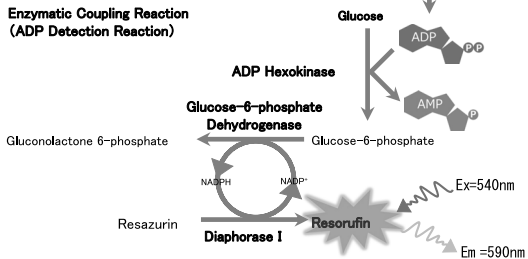
※ Z'-factor is one of the static values to evaluate the performance of the HTS assay in terms of sensitivity and accuracy. The Z'-factor > 0.5 indicated the robust assay.

### [Assay Principle]

#### Kinase Reaction



#### Enzymatic Coupling Reaction (ADP Detection Reaction)



- 1/20 -

### [Kit Contents]

No.		1,000 tests*	10,000 tests*
①	Substrate Solution For the enzymatic coupling reaction. [Glucose and NADP]	9mL	90mL
②	Resazurin Solution Resazurin is the precursor of red fluorescent resorufin. Dissolved in DMSO, please make sure the reagents are dissolving well before use.	100 μL	1mL
③	Enzyme Solution For the enzymatic coupling reaction. [ADP Hexokinase (from <i>Thermococcus litoralis</i> ), Glucose-6-phosphate Dehydrogenase (recombinant), Diaphorase I (from <i>Bacillus Stearothermophilis</i> )]	500 μL	5mL
④	Reductant Blocker For inactivation of the reductants (DTT, TCEP etc.). (For the endpoint assay use.) Dissolved in DMSO, please make sure the reagents are dissolving well before use.	400 μL	4mL
⑤	Stop Solution For stopping of the enzymatic coupling reaction. (For the endpoint assay use.)	10mL	100mL
⑥	10mmol/L ATP Solution For the kinase reaction and preparing a standard curve. Please use the provided ATP solution, because the commercial ATP may be contaminated with ADP.	100 μL	1mL
⑦	10mmol/L ADP Solution For preparing a standard curve.	100 μL	1mL

\*For 384 well plate (full volume type).

The test number is depending on the type of microwell plate.

	384 well plate Low volume	384 well plate Full volume	96 well plate
1,000 tests (Code No. 291-77401)	2,000 tests	1,000 tests	200 tests
10,000 tests (Code No. 297-77403)	20,000 tests	10,000 tests	2,000 tests

### [Materials required]

#### < Reagents >

- Ultrapure water  
Avoiding the contamination of ATPase or others.
  - High purity kinase
  - Substrate of kinase
  - The appropriate buffer for kinase reaction  
Phosphate buffer react with stop solution and this causes the fluorescence signal instability. In case of using the phosphate buffer in your kinase reactions, please avoid to use the stop solution.
- The acceptable concentration of the compounds are indicated on the following table.

- 2/20 -

Compounds	Acceptable concentration
NaCl [Sodium Chloride]	400mmol/L
CaCl <sub>2</sub> [Calcium Chloride]	20mmol/L
MgCl <sub>2</sub> [Magnesium Chloride]	100mmol/L
MnCl <sub>2</sub> [Manganese Chloride]	20mmol/L
DMSO [Dimethyl Sulfoxide]	10%
Triton X-100	0.40%
Tween20	0.40%
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> [Sodium Orthovanadate(V)]	1mmol/L
NaF [Sodium Fluoride]	20mmol/L
EDTA [Ethylenediaminetetraacetic Acid]	15mmol/L
DTT [Dithiothreitol]	
Endpoint assay	6mmol/L
Real-time assay	1mmol/L

※ Under the condition of 40mmol/L Tris-HCl (pH7.5), 20mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.1mg/mL BSA.

#### < Instruments >

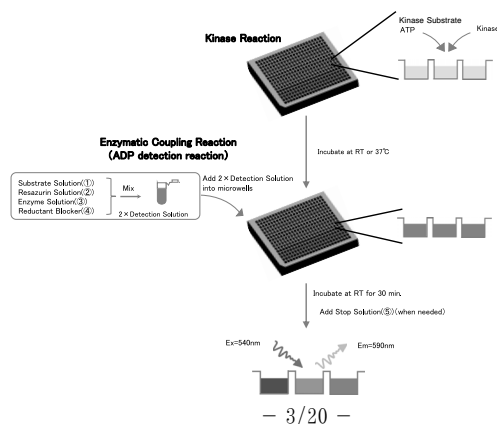
- Microwell plate**  
The black colored, low-binding microplates is suitable for the fluorescent measurement to avoid the noise signal and the non-specific absorption of proteins and peptides.
- Fluorescence microplate reader**  
For detection of the fluorescence of Resorufin.  
The following microplate readers are available ; Safire, Infinite F200, Infinite F500 [TECAN], EnVision [Perkin Elmer], PHERAstar [BMG LABTECH].  
Filters : Excitation : 540nm, Emission: 590nm (both bandwidth are 10nm)
- Microwell plate mixer**
- Plate seals**

#### 【 Assay methods 】

This kit is used for both the endpoint and the real-time assay.  
[CAUTION] Staurosporine (CAS No. 62996-74-1, serine-threonine kinase inhibitor) inhibits the enzymes including this kit. Please use other kinase inhibitor as the positive control before screening.

#### I . Endpoint Assay

- I-1. Preparation of the mixture of ADP and ATP (for the standard curve)
- I-2. Kinase reaction
- I-3. Preparation of 2 × Detection Reagent
- I-4. Quantitation of ADP amount



This assay method is described for using the low volume 384 well plate. Please adjust the volume of the reagents for other type of microwell plate.

	384 well plate Low volume	384 well plate Full volume	96 well plate
Kinase reaction solution	5 μL	10 μL	50 μL
2 × Detection Reagent	5 μL	10 μL	50 μL
Stop Solution <sup>※</sup>	5 μL	10 μL	50 μL

※ Stop solution : Specific inhibitor for the enzymatic coupling reaction.  
Usually, all of ADP in the enzymatic coupling reaction solution are expended for the resorufin production for 10 minutes after addition of 2 × Detection Reagent. The fluorescence signal of resorufin continues at least 7 hours. If kinase activity has been continued during the enzymatic coupling activity, the fluorescence would be increasing. Addition of stop solution stabilizes the fluorescence.

#### I-1. Preparation of the mixture of ADP and ATP (for the standard curve)

To estimate the ATP-to-ADP conversion rate in your kinase reaction, you can make the standard curve with provided ATP and ADP solutions. In the following steps, you make the ATP/ADP mixture for the standard curve. (Please regard the ATP concentration in your kinase reaction as the 0% conversion rate)

[Example for preparation] ATP concentration ; 10 μmol/L.

- (1) Dilute provided 10mmol/L ADP[⑦] and ATP[⑥] solution.  
Kinase reaction buffer : 10mmol/L ADP (and ATP) = 1,000 : 1
- (2) Mix 10 μmol/L ADP and ATP solution respectively at the rate below.

Conversion rate (%)	0	1	2	3	4	5	10	20	30	40	60	100
10μmol/L ADP(μL)	0	1	2	3	4	5	10	20	30	40	60	100
10μmol/L ATP(μL)	100	99	98	97	96	95	90	80	70	60	40	0
total(μL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

- (3) Add 5 μL of each ADP and ATP mixture solution (the conversion rate is 0~100%) to the low volume 384 well plate (n=2).

#### I-2. Kinase reaction

- (1) Perform kinase reaction with the arbitrary kinase, substrate and reaction buffer and ATP provided.
- (2) Adjust the final volume of kinase reaction mixture to 5 μL in the case of the low volume 384 well plate.

#### I-3. Preparation of 2 × Detection Reagent

- I-3-1. Calculation of the dilution rate of Resazurin Solution  
Please use the calculating formula below in order to suppress the signal of background to achieve high signal/background ratio (S/B ratio).

- ATP concentration at kinase reaction  $< 30 \mu\text{mol/L}$  :  
[Dilution rate of Resazurin Solution] =  $30 / [\text{ATP concentration at kinase reaction} (\mu\text{mol/L})]$
- ATP concentration at kinase reaction  $> 30 \mu\text{mol/L}$  :  
Please use Resazurin Solution without dilution.

Example) Perform kinase reaction with  $10 \mu\text{mol/L}$  ATP.  
[Dilution rate of Resazurin Solution] =  $30 / 10 = 3$   
The dilution rate of Resazurin Solution is threefold.  
It doesn't need to dilute in the case ATP concentration is over  $30 \mu\text{mol/L}$ .

### I-3-2. Preparation of $2 \times$ Detection Reagent

- Thaw the following reagents at room temperature. Substrate Solution[①], Resazurin Solution[②], Enzyme Solution[③] and Reductant Blocker[④]. Resazurin Solution[②] and Reductant Blocker[④] are dissolved in DMSO. Therefore, please make sure these reagents are dissolving well before use.
- Dilute Resazurin Solution[②] by ultrapure water. The dilution rate is calculated at I-3-1.
- Mix these solution ①-④ as the following table.

$2 \times$ Detection Reagent	Ratio (%)
Substrate Solution [①]	90
Diluted Resazurin Solution [②]	1
Enzyme Solution [③]	5
Reductant Blocker [④]	4
Total	100

- Mix well by vortex mixer.

### I-4. Quantification of ADP.

Quantification of ADP in the kinase reaction(I-2.) and the preparation of the standard curve(I-1.) using  $2 \times$  Detection Reagent on step of I-3-2.

- Add  $5 \mu\text{L}$  of  $2 \times$  Detection Reagent into the wells where the kinase reaction was performed and ADP/ATP mixture solution on the low volume 384 well plate.
- Mix well with the microplate mixer.
- Put the plate-seal on the plate and set it in the dark place for 30 minutes at room temperature.  
\*Stop Solution : Add  $5 \mu\text{L}$  of Stop Solution into each wells if you want to stop the enzymatic coupling reaction completely after this reaction.
- Measure the resorfin fluorescence signal with fluorescence microplate reader (Ex 540nm/Em 590nm).

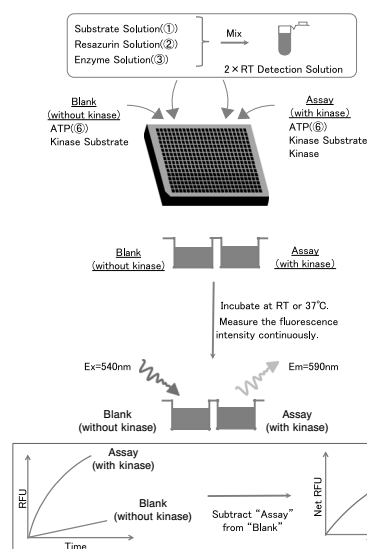
## II. Real-time Assay

The kinase kinetic can be measured with the following steps (real-time assay).

### II-1. Preparation of $2 \times$ RT Detection Reagent

### II-2. Preparation of the kinase substrate solution and the kinase solution with/without kinase

### II-3. Real-time quantification of ADP



(This is the case of assay of using low volume 384 well plate.)

### II-1. Preparation of $2 \times$ RT Detection Reagent

When you perform the real-time assay, please do not dilute the resazurin solution regardless of the ATP concentration in the kinase reaction.

Reductant blocker may inhibit the kinase reactions. Therefore, please do not add the reductant blocker in the  $2 \times$  RT detection reagent.

- Thaw the following reagents at room temperature. Substrate Solution[①], Resazurin Solution[②] and Enzyme Solution[③]. Resazurin is dissolved in DMSO. Therefore, please make sure the reagents is dissolving well before use.
- Mix these solution ①~③ as the following table.

$2 \times$ RT Detection Reagent	Ratio (%)
Substrate Solution [①]	90
Resazurin Solution [②]	1
Enzyme Solution [③]	5
Ultrapure Water	4
Total	100

- Mix well by vortex.

### II-2. Preparation of the kinase and substrate solution with/without kinase

- Preparation of the kinase substrate solution  
Add the kinase substrate and  $10\text{mmol/L}$  ATP solution (attached with this kit) into the kinase reaction buffer.
- Preparation of kinase solution (Assay)  
Dilute the kinase stock solution by the kinase reaction solution.

\* $2 \times$  RT detection reagent do not contain the reductant blocker. Therefore, the reductant such as DTT in the kinase assay solution causes the continuous increase of the background signal during the real-time assay. At least  $1 \text{mmol/L}$  DTT is available for the real-time assay by subtracting the background signal from the assay signal. However, lower reductant concentration should be used for the less background signal.

- (3) Preparation of the Blank solution (Blank : without kinase)  
Prepare the kinase stock solution buffer (without kinase) and dilute it with the kinase reaction solution at the same ratio to (2).

### II-3. Real-time quantification of ADP

- (1) Add 2 × RT Detection Reagent, kinase substrate solution and kinase solution with/without kinases into the low volume 384 well plate.

	Blank [without kinase]	Assay [with kinase]
2 × RT Detection Reagent	5 μL	5 μL
Kinase substrate Solution	2.5 μL	2.5 μL
Kinase solution without kinase	2.5 μL	–
Kinase solution	–	2.5 μL

※This assay is in the case of using low volume 384 well plate. In the case of use other type of microwell plate, please add equal volume of 2 × RT Detection Reagent into combined solution of kinase substrate and kinase solution.

※Blank well is needed to determine the background signal.

- (2) Measure the fluorescence continuously at Ex 540nm/Em 590nm with fluorescence microplate reader.  
(3) Subtract the signal intensity of the blank well from that of the assay well, and calculate the net signal intensity.

※Because it takes about 10 minutes to convert ADP to resorufin in the enzymatic coupling reaction, it is difficult to measure the kinetics of kinases reaction which ends within 10 minutes.

### III. Optimization of ATP concentration, kinase substrate and kinase.

#### III-1. Optimization of ATP concentration

Please adjust the appropriate ATP concentration to get the sufficient signal intensity. In the case of inhibitors screening, high ATP concentration has possibility to interrupt the detection of ATP-competitive inhibitor. Please adjust the ATP concentration as low as in the range to get the sufficient signal intensity.

#### III-2. Optimization of the kinase substrate concentration

Please prepare the dilution series of kinase substrate and set the kinase substrate concentration to get the sufficient signal intensity.

#### III-3. Optimization of kinase concentration

Please prepare the dilution series of kinase and measure the concentration-dependent fluorescent intensity. Please adjust the appropriate kinase concentration which keep the linearity between kinase concentration and fluorescent intensity.

#### [Example for Use]

##### Standard curve of ADP

- Add 5 μL of several concentration ADP solution and 5 μL of 2 × Detection Reagent into the low volume 384 well plate.
- Keep at room temperature for 30 minutes.
- The fluorescent was determined with Safire [TECAN]. The result indicated that the standard curve keep linearity up to 30 μmol/L of ADP.

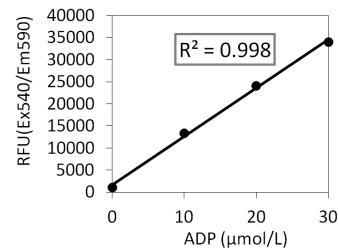


Fig. 1. Standard curve of ADP

#### ADP standard curve at the low substrate conversion rate.

- Prepare the several standard curve with the substrate conversion rate is 0~30% at ADP and ATP concentration is 1, 10 and 100 μmol/L.
- Add 5 μL of several rate of ADP/ATP solution and 5 μL of 2 × Detection Reagent into the low volume 384 well plate and keep at room temperature for 30 minutes.
- The fluorescent was determined with Safire [TECAN]. The result indicated that the quantitative capability is successful in the condition of the low substrate conversion rate.

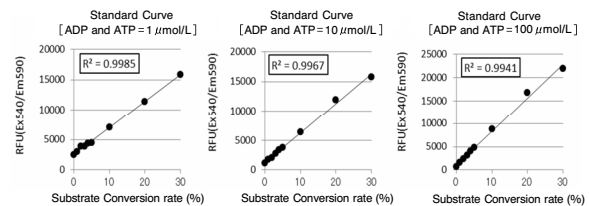


Fig. 2. Standard curve of ADP at the low substrate conversion rate.

#### Calculation of Z'-factor

Z'-factor is one of the statical values to evaluate the performance of the HTS assay in terms of sensitivity and accuracy. The Z'-factor at 0% and 5% conversion rate of 1, 10 and 100 μmol/L ADP/ATP concentration was calculated (n=16).

- Add 5 μL of ADP/ATP solution and 5 μL of 2 × Detection Reagent into the low volume 384 well plate and keep at room temperature for 30 minutes.
- The fluorescent was measured with Safire [TECAN]. The result indicated that excellent Z'-factor is acquirable in any ATP concentration.

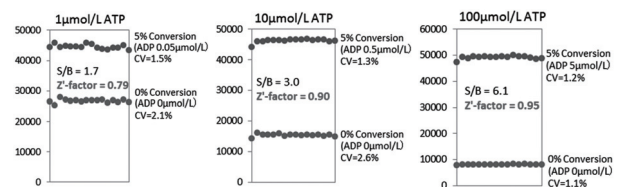


Fig. 3. Calculation of Z'-factor

### Inhibition curve of PKA by H-89

Preparation of the inhibition curve of cAMP-dependent protein kinase (PKA) by PKA specific inhibitor, H-89.

- 1) Add 5  $\mu\text{L}$  of kinase reaction solution (including PKA 0.02U/ $\mu\text{L}$ , ATP 5  $\mu\text{mol/L}$ , Kempeptide 125  $\mu\text{g/mL}$  and the several concentration of H-89) on the low volume 384 well plate and keep at room temperature for 30 minutes.
- 2) Add 5  $\mu\text{L}$  of 2  $\times$  Detection Reagent and keep at room temperature for 30 minutes.
- 3) The fluorescent was measured with Safire [TECAN]. The result indicated that the determined of  $\text{IC}_{50}$  value was consistent with the reference's value ( $\text{IC}_{50} = 40\text{nmol/L}^{1)}$ .

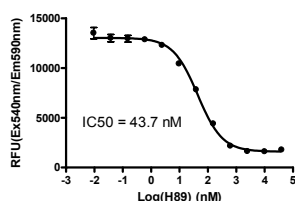


Fig. 4. PKA inhibition curve by H-89

### Calculation $K_m(\text{ATP})$ of PKA by the real-time assay.

- 1) Add 50  $\mu\text{L}$  of kinase reaction solution (including PKA 0.02U/ $\mu\text{L}$ , the several concentration of ATP and Kempeptide 100  $\mu\text{g/mL}$ ) and 50  $\mu\text{L}$  of 2  $\times$  RT Detection Reagent into the 96 well plate.
  - 2) Measure the fluorescence continuously at room temperature.
- Determine  $K_m(\text{ATP})$  of PKA by calculating the fluorescence increasing per unit time. The result indicated that  $K_m(\text{ATP})$  value of PKA was consistent with the reference's value ( $K_m = 3 \sim 15 \mu\text{mol/L}^{2)}$ .

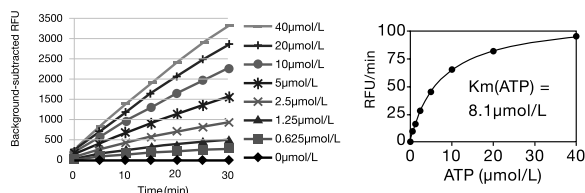


Fig. 5. Measurement of  $K_m(\text{ATP})$  of PKA

### [References]

- 1) Hidaka, H., Watanabe, M. and Kobayashi, K., "Properties and use of H series compounds as protein kinase inhibitors.", *Methods Enzymol.*, **201**, 328-39(1991).
- 2) Flockhart, D.A. and Corbin, J.D., "Regulatory mechanisms in the control of protein kinases.", *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **12**, 133-86(1982).
- 3) Kumagai, K., Kojima, H., Okabe, T. and Nagano, T., "Development of a highly sensitive, high-throughput assay for glycosyltransferase using enzyme-coupled fluorescence detection.", *Anal. Biochem.*, **447**, 146-155(2014).

### [Storage Condition]

Store at  $-20^\circ\text{C}$ . 10mmol/L ATP solution is at risk of decomposing into ADP by repeated freeze-thaw cycle which could be cause to increase its background. At the first thaw, we recommend dispensing into single-use amount to avoid freeze-thaw cycle.

It was checked that the kit components except for 10mmol/L ATP solution have little effect on several times of the freeze/thaw cycle.

## FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan  
Telephone : + 81-6-6203-3741  
Facsimile : + 81-6-6201-5964  
<http://www.wako-chem.co.jp>

### FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation

1600 Bellwood Road  
Richmond, VA 23237  
U.S.A.  
Telephone : + 1-804-271-7677  
Facsimile : + 1-804-271-7791  
<http://www.wakousa.com>

### FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH

Fuggerstrasse 12  
D-41468 Neuss  
Germany  
Telephone : + 49-2131-311-0  
Facsimile : + 49-2131-311100  
<http://www.wako-chemicals.de>

291-77401 (1,000 回用)  
297-77403 (10,000 回用)

## Fluorospark™ Kinase/ADP Multi-Assay Kit Fluorospark™ キナーゼ/ADPマルチアッセイキット

### 【はじめに】

シグナル伝達経路におけるタンパク質のりん酸化及び脱りん酸化反応は免疫応答、がん化、分化、アポトーシスや細胞増殖などの生命現象の調節に重要な役割を担っています。

キナーゼは、がんをはじめさまざまな疾患に密接に関与していることが知られているため、創薬の主要なターゲットとなっています。

“Fluorospark™ キナーゼ/ADPマルチアッセイキット”はキナーゼ反応によって生成されたADPを、酵素カップリング反応による簡便な操作で蛍光検出・定量するキットです。ADPの量に依存して生成したレゾルフィンの量を蛍光測定することで、キナーゼ活性を高感度に測定できます。さらに本アッセイ系はデータのばらつきが少なく、キナーゼ活性のエンドポイント測定だけでなく、経時的測定（リアルタイムアッセイ）も可能です。

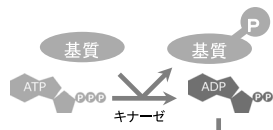
### 【特長】

- ・ ADP量に依存したレゾルフィンの蛍光強度検出により、高感度にキナーゼ活性を測定できます。
- ・ ADP 30 μmol/Lまでを直線性を保って測定できます。
- ・ 2×検出液をキナーゼ反応液に添加後、約30分でキナーゼ活性を測定できます。（エンドポイントアッセイ）
- ・ キナーゼ活性を経時的に測定できます。（リアルタイムアッセイ）
- ・ キナーゼに関わらず、ADPを生成する酵素に適用できます。
- ・ データのばらつきが少なく、基質変換率が低い場合でも高いZ'-factor※を取得できます。

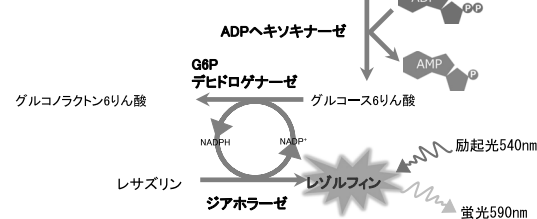
※ Z'-factor : High-Throughput Screening (HTS) において、それぞれのアッセイにおける反応が十分に保証されているかを判断するために用いられる統計的な指標。

### 【測定原理】

#### キナーゼ反応



#### 酵素カップリング反応 (ADP検出反応)



### 【キット内容】

No.	試薬	1,000 回用	10,000 回用
①	基質液 酵素カップリング反応で使用する基質が含まれています。 [グルコース、NADPを含む]	9mL	90mL
②	レサズリン液 蛍光物質レゾルフィンの前駆体であるレサズリンが含まれています。 DMSOに溶解しているため、使用前に十分に融解していることを確認して下さい。	100 μL	1mL
③	酵素液 酵素カップリング反応で使用する酵素が含まれています。 [ADP依存性ヘキソキナーゼ (Thermococcus litoralis由来)、グルコース-6-りん酸脱水素酵素(組換え体)、ジアホラーゼ I (Bacillus Stearothermophilis由来)を含む]	500 μL	5mL
④	還元剤ブロッカー キナーゼ反応で使った還元剤 (DTT, TCEPなど) の還元作用を抑制します。エンドポイントアッセイで使用します。 DMSOに溶解しているため、使用前に十分に溶解している事を確認して下さい。	400 μL	4mL
⑤	反応停止液 酵素カップリング反応を停止させるための溶液です。エンドポイントアッセイで使用します。	10mL	100mL
⑥	10mmol/L ATP溶液 キナーゼ反応及び検量線の作成に使用するATP溶液です。市販品は微量のADPが混入しているため、本キット付属のATP溶液を必ずご使用下さい。	100 μL	1mL
⑦	10mmol/L ADP溶液 検量線の作成に使用するADP溶液です。	100 μL	1mL

(本使用回数はフルボリウム384ウェルプレートを使用した場合の回数です)

本キットの使用回数はフルボリウム384ウェルプレートを使用した場合の回数です。他のマイクロウェルプレートを使用される場合、本キットの使用回数は下記の表を参考にして下さい。

	384ウェルプレート ローボリウム	384ウェルプレート フルボリウム	96ウェルプレート
1,000 回用 (Code No. 291-77401)	2,000 回	1,000 回	200 回
10,000 回用 (Code No. 297-77403)	20,000 回	10,000 回	2,000 回

**【キット以外に必要なもの】**

以下の試薬及び器具は本キットに含まれていません。実験前にご準備下さい。

**<試薬>**

- 超純水  
ATPaseなどの混入を防ぐため、本アッセイには超純水をご使用下さい。
- キナーゼ  
高純度のキナーゼをご使用下さい。ATPase活性を有するタンパク質が混入していると、バックグラウンドシグナルが上昇する恐れがあります。
- キナーゼ基質
- キナーゼ反応バッファー  
使用するキナーゼに適したバッファーをご使用下さい。ただし、反応停止液をご使用の場合はりん酸を含むバッファーのご使用を避けて下さい。  
なお、以下の表に示す化合物については許容濃度を確認しています。

化合物	許容濃度
NaCl [Sodium Chloride]	400mmol/L
CaCl <sub>2</sub> [Calcium Chloride]	20mmol/L
MgCl <sub>2</sub> [Magnesium Chloride]	100mmol/L
MnCl <sub>2</sub> [Manganese Chloride]	20mmol/L
DMSO [Dimethyl Sulfoxide]	10%
Triton X-100	0.40%
Tween20	0.40%
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> [Sodium Orthovanadate(V)]	1mmol/L
NaF [Sodium Fluoride]	20mmol/L
EDTA [Ethylenediaminetetraacetic Acid]	15mmol/L
DTT [Dithiothreitol]	
エンドポイントアッセイ	6mmol/L
リアルタイムアッセイ	1mmol/L

※ 40mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)、20mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.1mg/mL BSA 溶液でアッセイを行った場合の許容濃度。

**<器具>**

- マイクロウェルプレート  
バックグラウンドのシグナルを抑えるため、黒色プレートの使用を推奨します。また、マイクロウェルプレートへのタンパク質・ペプチドの吸着を防ぐため、低吸着性プレートのご使用を推奨します。
- 蛍光マイクロプレートリーダー  
レゾルフィンの蛍光を測定可能なプレートリーダーをご使用下さい。  
本キットの検出にはSafire、Infinite F200、Infinite F500 (TECAN社)、EnVision (PerkinElmer社)、PHERAstar (BMG LABTECH社) が使用可能なことを確認しています。  
フィルター式のプレートリーダーの場合、励起波長540nm/ 蛍光波長590nm (共に半値幅10nm) のフィルターのご使用を推奨します。
- マイクロプレートミキサー
- プレートシール

**【操作法】**

本キットはエンドポイントアッセイ (一定時間経過後のシグナル測定) と、リアルタイムアッセイ (経時的なシグナル測定) の2種類のアッセイが可能です。

(注) Staurosporine (CAS No. 62996-74-1) は本キットに含まれる酵素を阻害します。阻害剤スクリーニングなどで阻害剤のポジティブコントロールを設定する場合は、別途検討のうえ別の阻害剤をご使用下さい。

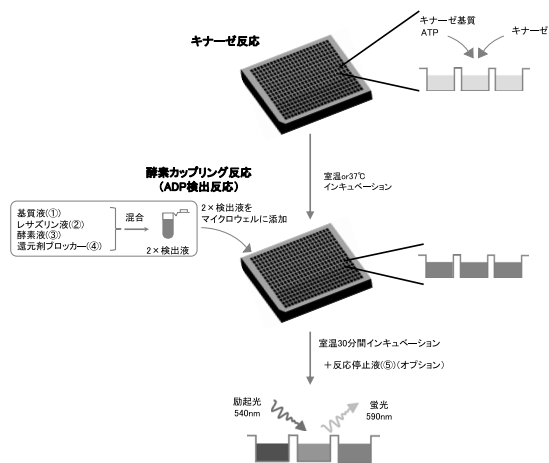
**I. エンドポイントアッセイ**

**I-1. ADP・ATP混合液の調製 (検量線の作成)**

**I-2. キナーゼ反応**

**I-3. 2×検出液の調製**

**I-4. ADPの定量**



本操作法はローボリューム384ウェルプレートを使用した場合の操作となります。他のマイクロウェルプレートを使用される場合は下記表を参考にキナーゼ反応液、2×検出液の添加量を調整して下さい。

	384ウェルプレート ローボリューム	384ウェルプレート フルボリューム	96ウェルプレート
キナーゼ反応液	5 $\mu$ L	10 $\mu$ L	50 $\mu$ L
2×検出液	5 $\mu$ L	10 $\mu$ L	50 $\mu$ L
反応停止液※	5 $\mu$ L	10 $\mu$ L	50 $\mu$ L

※反応停止液：2×検出液に含まれるカップリング酵素を特異的に阻害します。2×検出液を添加すると10分ほどで反応液中のADP全てがレゾルフィン生成に消費され、シグナルは安定化しますが、キナーゼ反応が酵素カップリング反応中も継続する場合、レゾルフィンによる蛍光シグナルが上昇し続けることがあります。そのような場合、反応停止液を添加することによってシグナルを安定化できます。

**I-1. ADP・ATP混合液の調製 (検量線の作成)**

キナーゼ反応液中の基質変換率 (添加ATPに対する生成ADPの割合) を確認する場合、キットに付属している10mmol/L ATP溶液、10mmol/L ADP溶液を用いて検量線を作成します。キナーゼ反応で用いたATP濃度を0%変換率とし、各変換率の溶液を調製します。

例) キナーゼ反応に用いるATP濃度が10  $\mu\text{mol/L}$ の場合

- 10mmol/L ADP溶液、10mmol/L ATP溶液をキナーゼ反応で使用する反応バッファーで1,000倍希釈し、10  $\mu\text{mol/L}$  ADP溶液、10  $\mu\text{mol/L}$  ATP溶液を作製する。
- 以下のような割合で10  $\mu\text{mol/L}$  ADP溶液、10  $\mu\text{mol/L}$  ATP溶液を混合する。

変換率 (%)	0	1	2	3	4	5	10	20	30	40	60	100
10 $\mu\text{mol/L}$ ADP( $\mu\text{L}$ )	0	1	2	3	4	5	10	20	30	40	60	100
10 $\mu\text{mol/L}$ ATP( $\mu\text{L}$ )	100	99	98	97	96	95	90	80	70	60	40	0
合計( $\mu\text{L}$ )	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

- (2) で作製した0~100%変換率の希釈系列5  $\mu\text{L}$ をローボリューム384ウェルプレートにn=2で分注する。

### I-2. キナーゼ反応

- 任意のキナーゼ、基質、キット付属のATPを用いてキナーゼ反応を行う。
- ローボリューム384ウェルプレートを使用する場合、最終的な反応液量が5  $\mu\text{L}$ になるように反応系を組み立てる。

### I-3. 2×検出液の調製

#### I-3-1. レサズリン液の希釈倍率算出

バックグラウンドのシグナルを抑えて、高いシグナル/バックグラウンド比 (以下S/B比) を取得するために、キナーゼ反応に使用したATP濃度に応じてレサズリン液の添加量を最適化します。ここでは、以下の式によりレサズリン液の希釈倍率を算出します。

- キナーゼ反応で使用するATP濃度が30  $\mu\text{mol/L}$  未満の場合  
[レサズリン液の希釈倍率] = 30/[キナーゼ反応で使用したATP濃度 ( $\mu\text{mol/L}$ ) ]
- キナーゼ反応で使用するATP濃度が30  $\mu\text{mol/L}$  以上の場合  
レサズリン液は希釈せずに使用

例) ATP濃度10  $\mu\text{mol/L}$ でキナーゼ反応を行う場合  
[レサズリン液の希釈倍率] = 30/10 = 3  
となるため、レサズリン液の希釈倍率は3倍となります。  
一方、ATP濃度が30  $\mu\text{mol/L}$ の場合はレサズリン液を希釈する必要はありません。

#### I-3-2. 2×検出液の調製

- 基質液[①]、レサズリン液[②]、酵素液[③]、還元剤ブロッカー[④]を室温で融解する。  
レサズリン液、還元剤ブロッカーはDMSOに溶解しているため、十分に融解していることを確認する。
- I-3-1. で算出したレサズリン液の希釈倍率をもとに、レサズリン液[②]を超純水で希釈する。
- 基質液、(2) で希釈したレサズリン液、酵素液、還元剤ブロッカーを下記の比率で混合し、2×検出液を調製する。

2×検出液の調製	比率 (%)
基質液 [①]	90
(2) で希釈したレサズリン液 [②]	1
酵素液 [③]	5
還元剤ブロッカー [④]	4
合計	100

- ボルテックスミキサーで2×検出液をよく混合する。

### I-4. ADPの定量

I-3-2. で調製した2×検出液を使用し、キナーゼ反応液 (I-2.) 中、もしくは検量線 (I-1.) 用のADPの定量を行います。

- ローボリューム384ウェルプレート上のキナーゼ反応液5  $\mu\text{L}$ もしくは、各ADP・ATP混合液5  $\mu\text{L}$  (n=2) に2×検出液5  $\mu\text{L}$ を添加する。
- マイクロプレートミキサーにより、よく攪拌する。
- プレートシールを貼り、暗所にて室温30分間静置する。  
※反応停止液: 静置反応後、酵素カップリング反応を完全に停止させる場合は反応停止液を5  $\mu\text{L}$ 添加。
- 蛍光マイクロプレートリーダーを使用して励起波長540nm/蛍光波長590nmのフィルターでレゾルフィンの蛍光測定を行う。

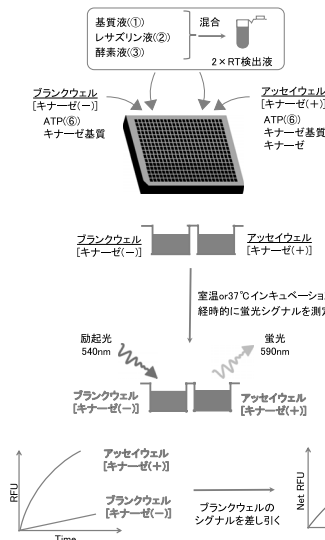
## II. リアルタイムアッセイ

リアルタイムアッセイでは、キナーゼの活性を経時的に測定できます。リアルタイムアッセイでは、以下の3つの工程に沿って実験を進めます。

### II-1. 2×RT検出液の調製

### II-2. キナーゼ基質液、キナーゼ溶液、キナーゼ未添加バッファーの調製

### II-3. キナーゼ活性 (産生ADP量) の経時的測定



(本操作法はローボリューム384ウェルプレートを使用した場合の操作例となります)



## II-1. 2×RT検出液の調製

リアルタイムアッセイではキナーゼ反応で使用するATP濃度に関わらず、レサズリン液は希釈しません。また、還元剤ブロッカーはキナーゼ活性を阻害する可能性があるため添加しません。

- (1) 基質液[①]、レサズリン液[②]、酵素液[③]を室温で融解する。レサズリン液はDMSOに融解しているため、十分に融解していることを確認する。
- (2) 基質液、レサズリン液、酵素液、超純水を下記の比率で混合し、2×RT検出液を調製する。

2×RT検出液の調製	比率 (%)
基質液 [①]	90
レサズリン液 [②]	1
酵素液 [③]	5
超純水	4
合計	100

- (3) ボルテックスミキサーで2×RT検出液をよく混合する。

## II-2. キナーゼ基質液、キナーゼ溶液、キナーゼ未添加バッファの調製

- (1) キナーゼ基質液の調製  
キナーゼ反応バッファに、キナーゼ基質と本品付属のATPを混合する。
- (2) キナーゼ溶液の調製 (アッセイウェル用)  
キナーゼ反応バッファでキナーゼのストック溶液を希釈する。  
※リアルタイムアッセイでは還元剤ブロッカーを使用しないため、DTTなどの還元剤を添加することによりバックグラウンドのシグナルが上昇します。1mmol/L DTTを添加した反応において、ブランクのシグナルを差し引くことでリアルタイムアッセイが可能であることを確認していますが、還元剤の添加濃度はできるだけ低く設定して下さい。
- (3) キナーゼ未添加バッファの調製 (ブランクウェル用)  
キナーゼ反応バッファで、キナーゼストック溶液と同じ組成のバッファを(2)と同じ割合で希釈する。

## II-3. キナーゼ活性のリアルタイム測定

- (1) 2×RT検出液、キナーゼ基質液、キナーゼ溶液 (もしくはキナーゼ未添加バッファ) をローボリューム384マイクロプレートウェルへ添加する。

	ブランク [キナーゼ (-)]	アッセイ [キナーゼ (+)]
2×RT 検出液	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
キナーゼ基質	2.5 $\mu$ L	2.5 $\mu$ L
キナーゼ未添加バッファ	2.5 $\mu$ L	-
キナーゼ溶液	-	2.5 $\mu$ L

※上記液量はローボリューム384ウェルプレートを使用した場合の液量です。実際にはキナーゼ基質液 + キナーゼ (+/-) 溶液の液量と2×RT検出液の液量が等量になるように反応系を構成して下さい。

※バックグラウンドシグナルの上昇を評価するために、必ずブランクウェルを設けて下さい。

- (2) 蛍光マイクロプレートリーダーを使用し、励起波長540nm/蛍光波長590nmのフィルターでレゾルフィンの蛍光を経時的に測定する。
- (3) アッセイウェル[キナーゼ (+)]のシグナルから、ブランクウェル[キナーゼ (-)]のシグナルを差し引き、正味のキナーゼ活性のシグナルを算出する。

※ADPの定量反応には10分程度を要します。そのため、その時間で反応が終了するキナーゼのリアルタイムアッセイは困難です。

## III. キナーゼ、ATP、キナーゼ基質の濃度の最適化

### III-1. ATP濃度の最適化

十分なシグナル強度が得られるようにATP濃度を設定してください。阻害剤スクリーニングを行う場合は、高濃度のATPを添加するとATP競合型阻害剤を適切に検出することができなくなる可能性がありますので、十分なシグナル強度が得られる範囲でATP濃度を低く抑えてアッセイを行ってください。

### III-2. キナーゼ基質濃度の最適化

キナーゼ基質の希釈系列を作製し、十分なシグナル強度が得られる濃度に設定してください。

### III-3. キナーゼ濃度の最適化

適切な条件でアッセイを行うために、キナーゼ濃度の検討を行う必要があります。キナーゼの希釈系列を作製してキナーゼ濃度依存的な蛍光強度の変化を測定し、キナーゼ濃度と蛍光強度の関係に直線性がある範囲で、キナーゼ濃度を設定してください。

### 【データ例】

#### ADP検量線

- 1) ローボリューム384ウェルプレート上で各濃度のADP溶液 5  $\mu$ Lに対して2×検出液 5  $\mu$ Lを添加。
- 2) 室温で30分間静置。
- 3) レゾルフィンの蛍光はSafire (TECAN社)で検出した。その結果、30  $\mu$ mol/LまでのADPを直線性良く定量できることが示された。

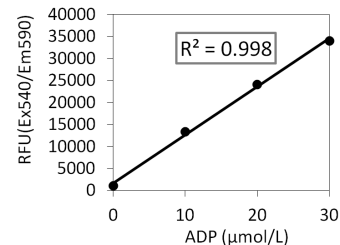


図1: ADP検量線の作成

#### 低基質変換率におけるADP検量線

- 1) ADP + ATP = 1, 10, 100  $\mu$ mol/Lにおける基質変換率0%~30%の検量線を作成した。
- 2) ローボリューム384ウェルプレート上で、各濃度のADP/ATP溶液 5  $\mu$ Lに対して2×検出液 5  $\mu$ Lを添加し、室温で30分間静置した。
- 3) レゾルフィンの蛍光をSafire (TECAN社)で検出した結果、基質変換率が低い場合も、定量性が良好であることが示された。

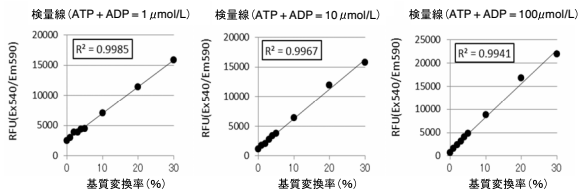


図2：低基質変換率におけるADP検量線

### Z'-factorの算出

Z'-factorは、感度と精度の両面からアッセイ系を評価する指数である。本キットを使用し、ADP + ATP = 1, 10, 100 μmol/L、基質変換率0%及び5% (n = 16) におけるZ'-factorを算出した。

- 1) ローボリューム384ウェルプレート上で各濃度のADP/ATP溶液5 μLに対して2 × 検出液5 μLを添加し、室温で30分間静置した。
- 2) レゾルフィンの蛍光をSafire (TECAN社) で検出した結果、いずれのATP濃度においても良好なZ'-factorを取得可能なことが示された。

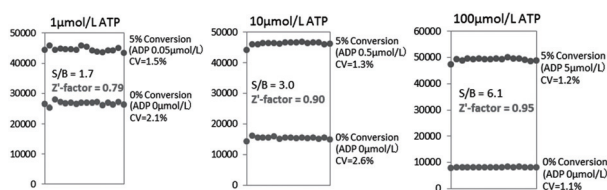


図3：Z'-factorの算出

### H-89によるPKA阻害曲線の作成

cAMP-dependent protein kinase (PKA) の特異的阻害剤であるH-89の阻害曲線を作成した。

- 1) ローボリューム384ウェルプレート上で、5 μLの反応系 (PKA 0.02U/μL、ATP 5 μmol/L、Kemptide 125 μg/mL、各濃度のH-89) を構築し、室温で30分間静置してキナーゼ反応を行った。
- 2) 次に2 × 検出液5 μLを添加して30分間静置した。
- 3) レゾルフィンの蛍光をSafire (TECAN社) で検出した結果、文献値 (IC<sub>50</sub> = 40nmol/L<sup>(1)</sup>) とほぼ同等のIC<sub>50</sub>値が得られた。

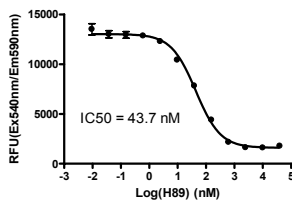


図4：H-89によるPKAの阻害曲線

### リアルタイムアッセイによるPKAのKm (ATP) 値の算出

- 1) 96ウェルプレートに、50 μLの反応系 (PKA 0.02U/μL、各濃度のATP、Kemptide 100 μg/mL) 2 × RT検出液50 μLを添加。
- 2) 室温に静置しながら蛍光強度を経時的に測定した。
- 3) 測定値から単位時間当たりの蛍光強度の増加量を算出し、PKAのKm (ATP) 値を求めた。その結果、文献値 (Km = 3 ~ 15 μmol/L<sup>(2)</sup>) とほぼ同等のPKAのKm (ATP) 値が得られた。

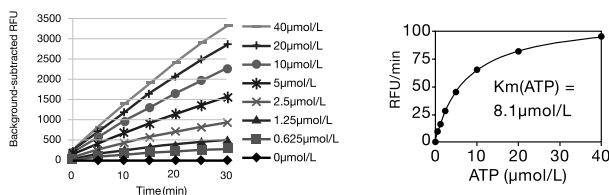


図5：PKAのKm (ATP) 値の測定

### [参考文献]

- (1) Hidaka, H., Watanabe, M. and Kobayashi, K., "Properties and use of H series compounds as protein kinase inhibitors.", *Methods Enzymol.*, **201**, 328-39(1991).
- (2) Flockhart, D.A. and Corbin, J.D., "Regulatory mechanisms in the control of protein kinases.", *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **12**, 133-86(1982).
- (3) Kumagai, K., Kojima, H., Okabe, T. and Nagano, T., "Development of a highly sensitive, high-throughput assay for glycosyltransferase using enzyme-coupled fluorescence detection.", *Anal. Biochem.*, **447**, 146-155(2014).

### [保存条件]

- 20℃保存。10mmol/L ATP溶液は凍結融解の繰り返しによりADP量が増し、バックグラウンドのシグナルが上昇する恐れがあります。最初の融解の際には凍結融解の繰り返しを避けるため、1回の実験で使用する量に分注することを推奨します。

10mmol/L ATP溶液以外のキット構成液については数回までの凍結融解において影響がないことを確認していますが、過度の凍結融解は避けて下さい。

製造発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社  
大阪市中央区道修町三丁目1番2号  
Tel : 06-6203-3741

1801KA1