

## Fluorospark® Kinase/ADP Multi-Assay Kit

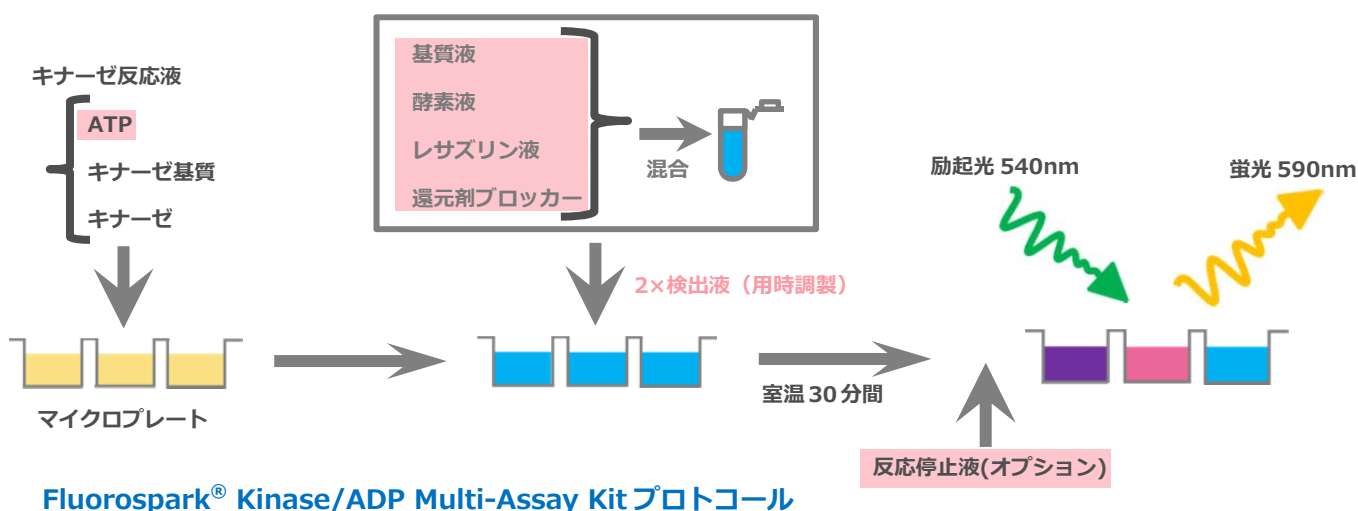
Spark® 20M、Spark® 10M マルチモードプレートリーダー蛍光測定

### はじめに

#### Fluorospark® Kinase/ADP Multi-Assay Kit

シグナル伝達経路におけるタンパク質のリン酸化及び脱リン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る。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る。

Fluorospark® Kinase/ADP Multi-Assay Kit 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・定量するキットである。本キットを用いて 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る。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）も可能である。本アプリケーションノートでは、Fluorospark® Kinase/ADP Multi-Assay Kit による ADP 検量線を TECAN 社マルチプレートリーダー Spark 20M、Spark 10M を用いて作成し、感度、精度、測定時間において比較検討を行い、高精度で短時間に測定できることを確認した。



## キナーゼ反応

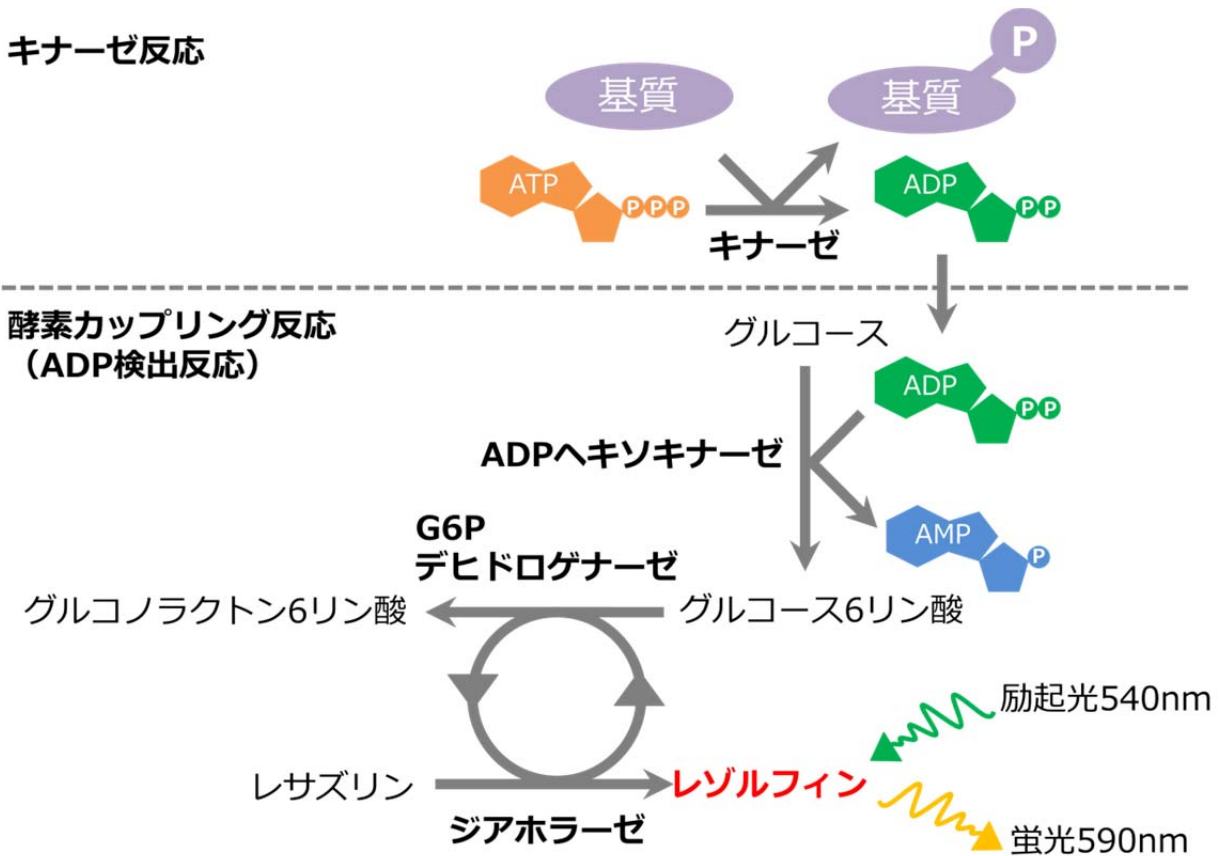


図1. Fluorospark® Kinase/ADP Multi-Assay Kitによるキナーゼ活性測定の実理

## 材料および方法



## 測定機器

- ・ Spark 20M マルチモードプレートリーダー
- ・ Spark 10M マルチモードプレートリーダー

## 試薬

- ・Fluorospark® Kinase/ADP Multi-Assay Kit (Wako Code : 291-77401)

## マイクロプレート

- ・384 ウェル（平底、黒色、スモールボリューム）マイクロプレート（Greiner Code:784900）

## 方法

最初に、 $[ATP]+[ADP]=10\mu M$ 、ATP-to-ADP Conversion Rate が 0%~100%における ADP 希釈系列を調製し、1 ウェルあたり  $5\mu L$  ずつ添加した（表 1）。次に Fluorospark® Kinase/ADP Multi-Assay Kit に含まれる基質液、酵素液、レサズリン液、還元剤ブロッカーを混合して 2×検出液を用事調製し、ADP 希釈系列を添加したウェルに  $5\mu L$  ずつ添加した。その後、室温で 30 分間インキュベーションし、Spark 20M または Spark 10M マルチモードプレートリーダーで蛍光強度を測定し、ADP 検量線を作成した。また、アッセイ系が HTS に適合しているか確認するために、 $[ATP]+[ADP]=10\mu M$ 、ATP-to-ADP Conversion Rate 10%における  $Z'$ -factor の算出を行った。 $Z'$ -factor は、以下の式で計算した。

$$Z' \text{-factor} = 1 - (3 \times SD_H + 3 \times SD_L) / (AVE_H - AVE_L)$$

なお、 $SD_H$  と  $SD_L$  は ATP-to-ADP Conversion Rate 10%と 0%の各標準偏差を、 $AVE_H$  と  $AVE_L$  は ATP-to-ADP Conversion Rate 10%と 0%の各平均値を表す。 $Z'$ -factor 測定パラメーターおよび装置設定は、下記の通りである。

## Spark 測定条件設定

Spark® 20M		Spark® 10M	
Measurement parameter	Instrument setting	Measurement parameter	Instrument setting
Plate name	GRE384sb	Plate name	GRE384sb
Mode	Fluorescence Top Reading	Mode	Fluorescence Top Reading
Excitation wavelength	535nm	Excitation wavelength	535nm
Excitation bandwidth	25nm	Excitation bandwidth	25nm
Emission wavelength	590nm	Emission wavelength	590nm
Emission bandwidth	20nm	Emission bandwidth	20nm
Gain	Optimal	Gain	Optimal
Mirror	Dichroic 560	Mirror	50% Mirror
Number of flashes	30	Number of flashes	30
Integration time	40 $\mu$ s	Integration time	40 $\mu$ s
Lag time	0 $\mu$ s	Lag time	0 $\mu$ s
Settle time	0 $\mu$ s	Settle time	0 $\mu$ s
Z-position	23102 $\mu$ m	Z-position	23102 $\mu$ m

## 結果

Spark 20M と Spark 10M による ADP 検量線を図 2 に示す。Spark 20M、Spark 10M、いずれにおいても、フィルター方式、モノクロメーター方式の両方で ATP-to-ADP Conversion Rate 0~100%における直線性が認められた。また、ADP 低濃度領域（ATP-to-ADP Conversion Rate 0~10%）においても十分な直線性が得られており、ADP 生成量が少ない場合でも正確な定量ができることが示された。また、フラッシュ回数：5、10、20、30 回における Z' -factor と測定時間の比較を行った（表 2）。Z' -factor を比較した結果、いずれのフラッシュ回数においても Z' -factor が 0.5 以上となり、少ないフラッシュ回数でも精度の高い安定した結果が得られることが示された。また、Spark 20M では、フラッシュ回数が 5 回でも 0.8 程度の Z' -factor を取得することができた。さらに、Spark 20M の測定時間は Spark 10M に比べて短いため、HTS に最適な測定機器であると考えられる。

ATP-to-ADP Conversion (%)	ADP ( $\mu\text{M}$ )	ATP( $\mu\text{M}$ )	ADP + ATP ( $\mu\text{M}$ )
0%	0	10	10
1%	0.1	9.9	10
2%	0.2	9.8	10
3%	0.3	9.7	10
4%	0.4	9.6	10
5%	0.5	9.5	10
10%	1	9	10
20%	2	8	10
30%	3	7	10
40%	4	6	10
60%	6	4	10
100%	10	0	10

表 1. ADP の希釈系列

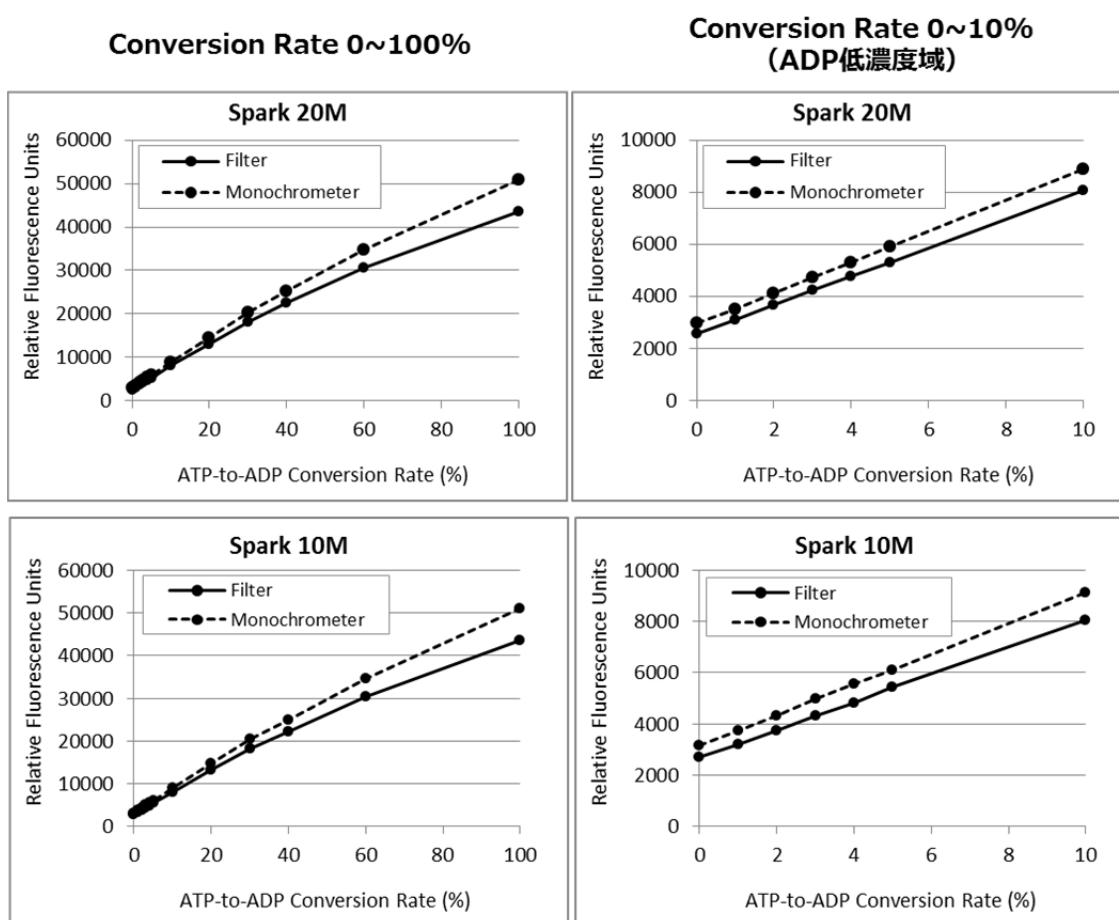


図 2. Fluorospark<sup>®</sup> Kinase/ADP Multi Assay Kit による ADP 検量線

## Z'-factorの比較 (n=96)

Number of flashes	5	10	20	30
Spark 20M Filter	0.805	0.816	0.822	0.826
Spark 20M Monochromator	0.788	0.789	0.792	0.795
Spark 10M Filter	0.635	0.693	0.760	0.784
Spark 10M Monochromator	0.754	0.778	0.812	0.821

※ Z'-factorはHTSのアッセイ系に使われる指数。1.0に近いほど、優れたアッセイ系といえる

## 測定時間の比較 (sec)

Number of flashes	5	10	20	30
Spark 20M Filter	20	30	53	70
Spark 20M Monochromator	20	31	53	70
Spark 10M Filter	29	47	88	128
Spark 10M Monochromator	28	48	89	129

表 2. Spark Z' -factor および測定時間

## 結論

Tecan社のSpark 20MとSpark 10Mは、優れたアッセイ精度を誇る測定システムであり、Fluorospark® Kinase/ADP Multi-Assay Kitと組み合わせることで、高感度・高精度にADPを測定できることが示された。特にSpark® 20Mでは、少ないフラッシュ回数でも安定した結果が得られており、大量のプレートを短時間・高精度で測定する必要のあるHTSにおいて、最適なマルチプレートリーダーである。

以上

## 参考文献

1) Kumagai, K. *et al.*: *Anal. Biochem.*, 447, 146-155 (2014).

## 製品紹介 URL

- 1) 試薬 [www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/KinaseADP\\_kit/index.htm](http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/KinaseADP_kit/index.htm)
- 2) プレートリーダー [www.wako-chem.co.jp/siyaku/kiki/multi/spark/index.htm](http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/kiki/multi/spark/index.htm)