

使用実例

必要試薬, 機器

- GGCT リコンビナント蛋白:一般市販品

例えば, OriGene カタログ商品コード TP720189 の使用実績はあります。

- LISA-101:ペプチド研究所 カタログ商品コード 3234

「200 μ M LISA-101 ストック液の調製方法」

LISA-101 が最終的に 200 μ M になるように 0.2 mM HEPES buffer, pH 7.0 で溶解 [2 mg (含量 80%) の場合, 15.5 mL に溶解] させ, その後例えば 1 mL ずつに分注します。分注品は, 遮光下 -20°C で 1 年程度は使用実績があります。使用前に dH_2O で 2 倍希釈し, 100 μ M としてから使用してください。

- 100 mM Tris-HCl (pH 8):一般市販品

例えば, ナカライ 06938-44 1 M Tris-HCl pH 8.0 100 mL を dH_2O で 10 倍希釈。

- DMSO:一般市販品 例えば, ナカライテスク カタログ商品 コード 13445-45

- マルチプレートリーダー

- 96 ウェルプレート:Corning 3915 黒色, 平底, 無処理, 蓋なし (プレーリーダーに合わせて購入する)

測定例

GGCT 0 ng	GGCT 5 ng	GGCT 10 ng	GGCT 20 ng	GGCT 50 ng	GGCT 100 ng	
50 μ L	40 μ L	40 μ L	40 μ L	40 μ L	40 μ L	dH_2O
40 μ L	40 μ L	40 μ L	40 μ L	40 μ L	40 μ L	Tris-HCl
X	10 μ L (0.5 ng/ μ L)	10 μ L (1 ng/ μ L)	10 μ L (2 ng/ μ L)	10 μ L (5 ng/ μ L)	10 μ L (10 ng/ μ L)	GGCT
10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L	LISA-101
酵素反応終了後に DMSO を添加します。						
100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L	DMSO

*各条件, 3 ウェル程度で並行実施するとよい。

操作

5 mL tube に 100 mM Tris-HCl, pH 8 (以下, Tris-HCl) を 3 mL くらい分注する

↓ dH_2O を各量 96 ウェルプレートに分注する

↓ Tris-HCl を各量 96 ウェルプレートに分注する

↓ GGCT を Tris-HCl にて希釈する(酵素は希釈すると失活するのでここからは素早く)

- ↓ 96 ウェルプレートに希釈した GGCT を 10 μ L ずつ添加 (連続分注器で低濃度から)
- ↓ プレートをゆっくり左右に揺らして mix
- ↓ 100 μ M LISA-101 を 10 μ L ずつ添加 (連続分注器で低濃度から)
 - ⇒ (total 100 μ L/well)
- ↓ プレートシールをし, アルミホイルで遮光
- ↓ プレートをプレートミキサーで揺する (30 sec)
- ↓ 37 $^{\circ}$ C で 30 min インキュベート [酵素反応]
- ↓ DMSO 100 μ L/well を加える (total 200 μ L/well) [DMSO 添加により酵素を失活させ, 引き続きインキュベートすることで化学的な蛍光増大反応を完結させます]
- ↓ 37 $^{\circ}$ C で 60 min インキュベート [蛍光増大反応の完結に必要な化学反応]
- ↓ マルチプレートリーダーで蛍光測定
- Excitation: 530 nm
- Emission: 590 nm
- Mode: Top
- Gain: 最初は Optimal で設定
(Manual gain で 60 設定で測定実績あり)

※希釈した GGCT は廃棄する(翌日には持ち越せない)