

製品コード MK410

研究用

---

**TAKARA**

**Universal Tyrosine Kinase  
Assay Kit**

---

説明書

v202211Da

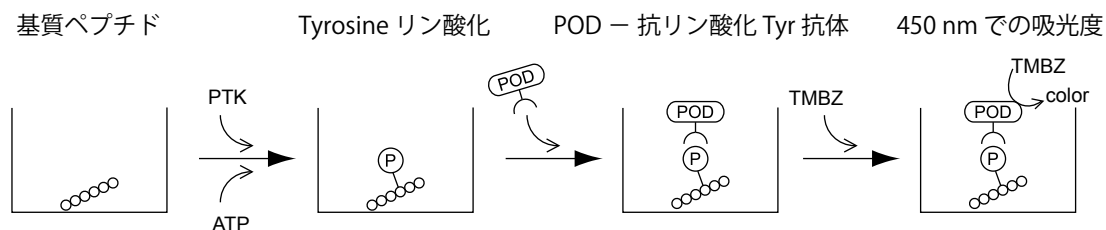
Protein Tyrosine Kinase (PTK) は細胞増殖や分化、癌化を制御しているシグナル伝達経路に含まれる重要な酵素です。PTKは大きく分けて受容体型と非受容体型の2種類に分類されます。受容体型は、ホルモンや増殖因子などのリガンドが結合する細胞外ドメインならびに膜貫通ドメイン、そしてPTKの活性部位が存在する細胞内ドメインからなり、その機能はリガンド結合による外部からのシグナルをTyrosineリン酸化反応として直接細胞内に伝達することにあります。この例としては、インスリンレセプターやEGFレセプターなどがあげられます。一方、非受容体型PTKは膜貫通ドメインをもたず、膜結合型、細胞質型、核局在型などが知られております。機能は多様で、トランスドューサーとして働くものや、細胞接着に応答するためのものなどがあり、この例としてはc-Src、FAKなどがあげられます。本キットは *in vitro* で Protein Tyrosine Kinase (PTK) 活性を定量するための non-RI ELISA キットです。広いレンジの PTK 特異性をもった単一基質ペプチドを用いていますので、種々の PTK の活性測定に有用です。

PTK 活性の測定は、これまで RI ( $^{32}\text{P}$ -ATP) を用いた非常に煩雑な操作によって行われていました。しかし、本キットでは RI を必要とせず、特異性レンジが広く、迅速に PTK 活性を測定することができます。また、組換え体 PTK を用いた PTK 活性の制御研究や、PTK 阻害剤の *in vitro* スクリーニングにも有用です。

#### 【本キットの特長】

- non-RI 法で、RI に匹敵する感度です。
- 簡便で迅速な検出が可能です。
- 種々の PTK に対して特異性があります。
- Protein Ser/Thr Kinase との交差反応はありません。
- バックグラウンドが低く、高感度です。
- 試薬調製が簡便です。
- Kinase 標準品が添付されています。
- 特異抗体との組み合わせで、特異 PTK 活性の測定が可能です。

## I. 原理



---

## II. キットの内容

(1) PTK Substrate Immobilized Microplate 合成ペプチド基質固相化 96 ウェル分離型マイクロタイタープレート (96 well : 8 well × 12 strips)	1 plate
(2) Kinase Reacting Solution Kinase 反应用緩衝液	11 ml
(3) 40 mM ATP-2Na (for 0.55 ml/H <sub>2</sub> O) (凍結乾燥品)	0.55 ml 用 × 2
(4) Extraction Buffer 細胞抽出用緩衝液	11 ml
(5) PTK Control Kinase 標準品 (凍結乾燥品、unit はロットごとに表示)	0.5 ml 用
(6) Anti phosphotyrosine (PY20) -HRP (for 5.5 ml/H <sub>2</sub> O) 抗リン酸化 Tyrosine-POD 標準抗体 (PY20) (凍結乾燥品)	5.5 ml 用
(7) Blocking Solution ブロッキング用緩衝液	11 ml
(8) HRP Substrate Solution (TMBZ) 発色試薬 (TMBZ)	12 ml

## III. キット以外に必要な試薬や器具 (主なもの)

1. 反応停止液：1キット分に 11 ml 必要  
Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (製品コード MK021) に含まれる反応停止液 (Stop Solution) をそのまま使用できます。  
別途、1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を調製して使用することも可能です。
2. 洗浄液：0.05 % Tween20 含有 PBS  
Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (製品コード MK021) に含まれる 10 × PBS と Tween 20 を用いて調製するのが便利です。
3. 37°C インキュベーター
4. マイクロタイタープレートリーダー (450 nm 付近のフィルターを有するもの)
5. 蒸留水
6. マイクロピペット (10 ~ 500 μl)
7. 2-メルカプトエタノール

## IV. 保存 4°C

---

## V. 試薬の調製

1. 合成ペプチド基質固相化プレート、細胞抽出用緩衝液、ブロッキング用緩衝液はそのまま使用する。
2. Kinase 反应用緩衝液  
2-メルカプトエタノールを最終濃度 10 mM になるように使用直前に添加する。  
調製した液は 2-メルカプトエタノールが不安定なため、必要量を用時調製する。  
具体的には市販の 2-メルカプトエタノール (99%) を 14.4 M とすると、1,440 倍となるように添加する。  
(注 1) 2-メルカプトエタノールは毒物です。2-メルカプトエタノール添加後の試薬の取扱いおよび廃棄方法には、ご注意ください。  
(注 2) Kinase 反应用緩衝液に着色や沈殿がみられる場合があります。品質には問題ありませんので、均一に混合してからご使用ください。
3. 40 mM ATP-2Na  
1 バイアル全量を 0.55 ml の蒸留水に溶解する。1 バイアルは 48 ウェル分に相当する。  
(注 3) 溶解後は保存せずその日のうちに使い切ってください。
4. Kinase 標準品  
1 バイアル全量を 100  $\mu$ l の蒸留水に溶解する。(なお、一度に全量使用しない場合はこの段階で小分け分注し -20°C で保存する。この状態で 2 週間は安定である。)次に、上記 2 で調製した 2-メルカプトエタノール添加済 Kinase 反应用緩衝液を 400  $\mu$ l 加え、最終 500  $\mu$ l (つまり、5 倍希釈液) にする。この溶液を最高濃度として、上記 2 で調製した 2-メルカプトエタノール添加済 Kinase 反应用緩衝液で 2 倍ずつ段階希釈し各濃度の標準品を用時調製する。0 濃度は 2-メルカプトエタノール添加済 Kinase 反应用緩衝液を用いる。標準品の活性 (U/ $\mu$ l) はロットによっても異なるので、測定ごとに検量線を作製する。
5. 抗リン酸化 Tyrosine-POD 標識抗体  
5.5 ml の蒸留水に溶解する。一度に使いきらない場合は -20°C に凍結保存する。この状態で 2 週間は安定である。凍結融解の繰り返しは避けること。
6. 発色試薬 (TMBZ)  
使用前に室温にもどしてそのまま使用する。使用前にすでに濃い青色に変色していないことを確認する。金属イオンと接触すると呈色するおそれがあるので注意する。数回に分けて使用する場合は予め必要量を取り分けて使用する。

---

## VI. サンプル調製法 (全タンパク質の抽出)

(注) サンプル数が多い場合細胞抽出用緩衝液が不足します。その場合は培養および抽出のスケールを適宜調節してください。

### 1. 浮遊細胞の場合

1 ~ 5 × 10<sup>6</sup> 細胞を PBS で洗浄し遠心後、ペレットとして細胞を回収する。この細胞ペレットに 1 ml の細胞抽出用緩衝液を加え、軽くボルテックスミキサーにかけ懸濁する。14,500 rpm (10,000 × g) で 4℃ 10 分間遠心分離し、上清をサンプルとして使用する。

### 2. 接着細胞の場合

直径 9 cm のシャーレで培養した細胞 (1 ~ 5 × 10<sup>6</sup> 細胞) から培地を取り除き、PBS で 1 度細胞が接着しているシャーレを洗浄後、1 ml の細胞抽出用緩衝液をシャーレに添加し、ラバーポリスマンで丁寧に細胞を剥がしとり回収する。14,500 rpm (10,000 × g) で 4℃ 10 分間遠心分離し、上清をサンプルとして使用する。

### 3. 小スケールの場合

96 ウェル培養プレートからの細胞の回収は細胞抽出用緩衝液の液量を 50 ~ 100 μl/well とし、ピペッティングにより細胞をはがし、上記 1、2 の方法で処理する。

### 4. PTK を特異抗体で免疫沈降し、特異な PTK 活性を測定する場合

- 1) 上記 1、2、3 の様に調製した全タンパク質抽出液 0.5 ~ 1 ml に ProteinA-agarose または ProteinG-agarose 50 μl を添加し、4℃ で 20 分間緩やかに振盪し反応させ非特異的吸着タンパク質を除く。
- 2) 10,000 × g で 4℃ 10 分間遠心後上清を別のチューブに移す。
- 3) この抽出液に目的 PTK に対する特異抗体を 5 ~ 30 μg 添加し室温で 1 時間反応させる。
- 4) これに新しい ProteinA-agarose または ProteinG-agarose を 30 μl 添加し、室温で 20 分間反応させる。10,000 × g で 4℃ 1 分間遠心し上清を除く。
- 5) 1 ml の PBS を沈殿に添加し再懸濁し、4℃ で 10 分間振盪反応させる。10,000 × g で 4℃ 1 分間遠心し、沈殿を回収する。この操作を合計 3 回行う。

得られた沈殿を 2 -メルカプトエタノール添加 Kinase 反応用緩衝液 150 μl で懸濁し検体 (ゲル懸濁液として 50 μl/well) として用い、Kinase 活性を測定する。

---

## VII. 測定操作

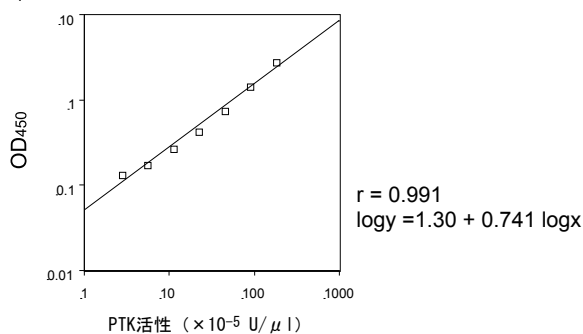
1. 上記のように調製したサンプルは通常 5 倍以上に Kinase 反应用緩衝液で希釈して検体として測定する（培養細胞抽出物の場合は 15 ~ 100 倍希釈を 1 つの目安にする）。上記調製サンプルは - 80℃ で数日安定であるが、希釈した検体はその日の内に測定する。
2. 各濃度の Kinase 標準液および測定検体を 40  $\mu$ l ずつマイクロピペットで各ウェルに加え（2 重測定をお勧めする）、さらに 40 mM ATP 溶液 10  $\mu$ l を添加しよく混合し 37℃ で 30 分間反応させる。（ATP の添加により反応がスタートする。インキュベーション時間が 45 分間以上になるとリン酸化タンパク質自身のプレートへの非特異的吸着が起こり、バックグラウンドが若干高くなる。）
3. 反応を終えたプレートは液を捨て、洗浄液（Tween-PBS）で 4 回洗浄後、ペーパータオル上で十分に液を切る。ブロッキング用緩衝液を 100  $\mu$ l/well ずつ加え 37℃ で 30 分静置する。
4. ブロッキング用緩衝液を捨てた後、ペーパータオル上でよく液を切る（洗浄する必要はありません）。抗リン酸化 Tyrosine 抗体 -POD 液を 50  $\mu$ l/well 添加し、37℃ で 30 分反応させる。
5. 反応液を捨て、洗浄液（Tween-PBS）で 4 回洗浄後、ペーパータオル上でよく液を切る。発色基質液を 100  $\mu$ l/well 添加する。37℃ で 15 分間の反応時間を目安にする。
6. 反応停止液を 100  $\mu$ l/well ずつ、発色基質液を添加したウェル順に、添加し反応を止める。
7. 波長 450 nm（この付近のフィルターであれば測定可能）で吸光度を測定し、Kinase 標準液の活性を横軸に、吸光度を縦軸にプロットして検量線を作成し、検体で得られた吸光度から Kinase 活性を算出する。発色は反応停止後 1 時間までは安定である。また、発色が強すぎ吸光度が 3.5 を超えるような場合には褐色沈殿が生じ測定値が低値になることがある。

## VIII. 性能

### 1. 特異性

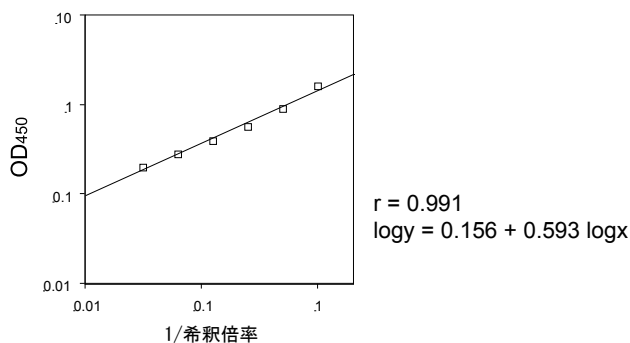
本キットは、PTK 活性による ATP の  $\gamma$  - リン酸基のプレート固相化ペプチド基質への転移を抗体によってモニタリングします。使用している抗リン酸化 tyrosine 抗体は、リン酸化 Ser/Thr には交差反応しませんので、PTK 活性を特異的に測定することができます。また、Ser/Thr kinase による妨害は認められません。

(a) rc-Src を用いた時の PTK 活性と吸光度との関係



活性 ( $\times 10^{-5}$ U/ $\mu$ l)	180	90	45	22.5	11.25	5.625	2.813	0
吸光度 (OD <sub>450</sub> )	2.753	1.448	0.741	0.422	0.265	0.172	0.133	0.075

(b) A431 細胞からの抽出液を用いた時の希釈直線性



希釈倍率	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
吸光度 (OD <sub>450</sub> )	1.625	0.899	0.565	0.394	0.280	0.198

---

## 2. 感度

Src kinase 活性として  $2.16 \times 10^{-5}$  U/ $\mu$ l サンプル (32 fmol/well に相当)。

## 3. 活性の定義

組換え体 c-Src の PTK 活性を基準としています。つまり、rc-Src が 1 pmol の ATP の  $\gamma$ -リン酸基を 37°C で 1 分間に基質 (KVEKIGEGTYGVVYK : p34<sup>cdc2</sup> の 6 ~ 20 残基) に転移させる活性を 1 U としています。キット内の標準品は c-Src 活性としての unit 数で表示しています。

## 4. 測定所要時間

酵素反応時間にもよりますが、通常 1.5 ~ 3 時間です。

## 5. 測定パラメータ

サンプル中の PTK 含量は、その由来により大きく変わりますので、実験の目的に合わせてサンプル濃度や反応時間などを変えてください。

## 6. 基質

種々の PTK に対して特異性を有する 1 種類の合成ペプチド基質 [ poly (Glu-Tyr) ] をウェルに固相化しています。

## 7. 測定範囲と標準曲線

PTK 活性は、キットに含まれる PTK 標準品の発色吸光度と比較して決定します。本キットの測定範囲は 32 fmol ~ 2 pmol/well ( $2.16 \times 10^{-5}$  ~  $135 \times 10^{-5}$  U/ $\mu$ l サンプル) です。

※ **標準品の活性 (U/ $\mu$ l) は、ロットにより異なります。**  
**正確な結果を得るためには、測定ごとに標準曲線を作成してください。**

## 8. サンプル中のリン酸化タンパク質による妨害

調製された PTK サンプル中には、チロシン残基がすでにリン酸化されたタンパク質が混入しており、また PTK の天然型基質も含まれていると考えられます。しかし、これらは次の洗浄工程でウェルから除かれますので問題ありません。なお、これらのウェルへの非特異的吸着が心配な場合は、市販の Nunc-Immuno Module plate, F8 (NUNC 社 Code. 468667) を対照プレートとして同様な操作を行い、バックグラウンドをチェックしてください。

## 9. サンプル中の内在性 Protein Tyrosine Phosphatase (PTP) による妨害

多くの場合、調製された PTK サンプル中には PTP が含まれています。本キットには、リン酸化された合成ペプチド基質の PTP による分解を防ぐため、細胞抽出用緩衝液と Kinase 反応用緩衝液には、それぞれ 1 mM sodium-orthovanadate、50 mM NaF が含まれています。



---

## IX. Q & A

Q1：この PTK 活性測定キットの原理は？

A1：従来は、 $^{32}\text{P}$ -ATP を用いて反応を行い、合成ペプチド基質へ取り込まれた  $^{32}\text{P}$  を電気泳動や TCA 沈殿法、ペーパーディスク吸着法などで分離し、放射能をカウントする方法が用いられてきました。本キットでは、合成ペプチド基質が固定化された 96 ウェルマイクロタイタープレートにサンプルと ATP を添加し、反応後リン酸化されたチロシンを抗リン酸化 Tyrosine-POD 標識抗体によって特異的に検出するという方法を用いています。

Q2：PTK 以外の kinase が検出されないか？

A2：Protein kinase には PTK のほかに、Ser/Thr kinases が存在します。しかし、検出系にリン酸化 Ser/Thr とは反応しない抗体を、また合成基質には Poly (Glu-Tyr) を用いているため、PTK 以外の protein kinase の活性を測り込むことは原理的に考えられません。

Q3：Protein Tyrosine Phosphatase (PTP) が測定を妨害しないか？

A3：細胞抽出液中には PTP ならびに Protein Phosphatase (PP) が存在しています。この影響を抑えるために、Sodium Vanadate と NaF (各々 PTP、PP の阻害剤) を細胞抽出用緩衝液と Kinase 反应用緩衝液に加えております。

Q4：細胞抽出検体中のリン酸化タンパク質が測定を妨害しないか？

A4：本キットでは、合成基質が予め固定化されていますので、検体中のリン酸化タンパク質は操作の途中で洗い流されてしまいます。したがって、最後の ELISA の段階で測定が妨害されることはありません。この点、ビオチン-アビジンの系で合成ペプチドをトラップする系より確実と思われれます。ただし、検体中のタンパク量が異常に多い場合は、非特異的にリン酸化タンパク質がプレートに吸着する場合があります。このような場合、検体を希釈して測定するか、市販の無処理 96 ウェルマイクロタイタープレートをブランクに用いてチェックを行ってください。ブランク測定を並行して行った場合は、1 キット当たり測定できる検体数は少なくなります。

Q5：検体としてはどのようなものが使用可能か？

A5：本キットは基本的に培養細胞、または血液などから分画された血球成分用に開発されています。組織検体についてのデータは TaKaRa では数例しかありませんが、この場合、組織と細胞抽出用緩衝液を混合し、ホモゲナイズし、遠心分離後の上清を測定に用いています。

Q6：キットに用いられている合成ペプチド基質の特異性スペクトルは？

A6：合成ペプチド基質としては Poly (Glu-Tyr) (4:1, 20 ~ 50 kDa) を用いています。本基質は FAK、ZAP-70、c-Src、EGF-R など広範囲の PTK 活性の測定に用いられています。他社のキットでは酵素特異的な合成基質が用いられており、広範囲の PTK 活性を測定するにはあらゆる多量の基質を準備する必要があり、大変面倒です。また、感度も十分とはいえません。本キットと PTK 特異抗体を組み合わせて用いることで、目的の PTK だけを単一の基質で non-RI で高感度に検出することができます。

Q7：活性の定義は？

A7：組換え体 c-Src の PTK 活性を基準にして設定しています。つまり、1 pmol の ATP の  $\gamma$  - リン酸基を 1 分間に基質 (KVEKIGEGTYGVVYK) に移転させる c-Src の活性を 1 U としています。

Q8：Kinase 標準品とは？

A8：培養細胞由来の Kinase 粗抽出物を凍結乾燥したもので、c-Src を基準としてロットごとに unit 管理されています。

Q9：本キットの測定感度と測定レンジは？

A9：検出感度は  $2.16 \times 10^{-5}$  U/ $\mu$ l で、測定範囲は  $2.16 \sim 135 \times 10^{-5}$  U/ $\mu$ l ( $86.4 \times 10^{-5} \sim 5,400 \times 10^{-5}$  U/well) です。

なお、実際の検体を他社キットと弊社キットで測定した場合の発色の度合の比較データを以下に示します。

A431 細胞または WiDr 細胞各々 ( $1 \times 10^7$  cells) を 1 ml の細胞抽出用緩衝液で抽出した検体を 3 倍希釈し、PTK 活性を両キットで測定したところ、次のように本キットの方がはるかに強い発色を示しました。

細胞	吸光度 (OD <sub>450</sub> )	
	本キット	他社キット
A431	2.207	0.748
WiDr	1.015	0.004

Q10：細胞は何個あれば検出可能か？

A10：細胞の種類、および加えられた刺激の種類と程度によっても異なりますが、たとえば U937 細胞、P3U1 細胞、Neuro2A 細胞の場合では、500 ~ 1,000 個あれば検出可能でした。

Q11：キットに添付されている細胞抽出用緩衝液に細胞を懸濁するだけで PTK の抽出が可能か？

A11：可能です。また、他社キットで用いられている抽出液 (EDTA、2-ME、PMSF、ベンザミジン含有 50 mM Tris-HCl, pH7.5) よりも本キットの方が PTK 抽出効率が優れています。両者の比較データを以下に示します。他社キット用の抽出緩衝液に細胞を懸濁して超音波破碎処理 (5 秒  $\times$  8) を行った検体 (1)、同じ細胞を本キットの細胞抽出用緩衝液に懸濁した検体 (2)、および (2) をさらに超音波破碎処理した検体 (3) について、本キットを用いて PTK 活性を測定しました。次に示す結果から、本キットの抽出緩衝液は、他社キットの抽出液に比べて PTK 抽出効率が良いこと、ならびに細胞を本キットの抽出用緩衝液に懸濁混和するだけで十分である (超音波処理を必要としない) ことがわかります。

抽出方法	PTK 活性 (OD <sub>450</sub> )
(1)	0.217
(2)	2.316
(3)	2.324

Q12：トラブルへの対応は？

A12：・バックグラウンドが高い：Kinase 反応時間を短く (約 15 分) してください。

・全体に発色が悪い：Kinase 反応時間を長く (約 60 分) してください。

・発色が異常に強い：検体中の PTK 活性が強すぎるものが考えられます。この場合は、例えば  $\times 5$ 、 $\times 15$ 、 $\times 45$ 、 $\times 135$ 、 $\times 405$  と段階希釈し、適当な希釈倍率を予め検討してください。

Q13：本キットを使用した応用例は？

A13：1) 胚発生に伴う PTK 活性の変動

11 日目と 15 日目のマウス胎児（通常 20 日で新生）を検体として用いて、PTK 活性を測定しました。

マウス胎児	PTK 活性 (U/mg protein)
11 日目	0.82
15 日目	25.6

2) IFN- $\gamma$  処理による PTK 活性の誘導

IFN- $\gamma$  (1,000 U/ml) で 48 時間処理した U937 細胞、および無処理の細胞の PTK 活性を本キットにより測定し、両者を比較しました。

処理	PTK 活性 ( $\times 10^{-5}$ U/ $10^6$ cells)
無処理	1.53
IFN- $\gamma$ 処理	2.39

3) 免疫沈降法との組合せによる、EGF-R ならびに FAK の PTK 活性の特異的測定

- (1) EGF (終濃度 10 ng/ml) を添加した RPMI-10% FCS 培地中で 48 時間培養した A431 細胞 ( $10^7$  cells/90 mm シャーレ) を、PBS で 1 回洗浄した後、細胞抽出用緩衝液を 1 ml 添加し、ラバーポリスマンで細胞を懸濁させ、1.5 ml エッペンドルフチューブに細胞懸濁液を回収した。
- (2) この液に Protein A-agarose を 50  $\mu$ l 加え、20 分間室温で静置した。10,000  $\times g$  で 5 分遠心分離し、上清を回収した。
- (3) この液に各種抗体を加えて良く混和し、室温で 1 時間放置した。
- (4) これに Protein A-agarose を 30  $\mu$ l 加えてよく混和し、さらに 20 分間室温で放置した。
- (5) 10,000  $\times g$  で 5 分間遠心分離して上清を除き、沈殿を 1ml の PBS で懸濁し、遠心洗浄した。この操作を合計 3 回繰り返した。
- (6) メルカプトエタノールを添加した Kinase 反応緩衝液 150  $\mu$ l を沈殿に加えて良く混和し、その懸濁液 50  $\mu$ l (ゲルを含んだ状態) をウェルに加えた。40 mM ATP を 10  $\mu$ l 加え、Kinase 反応を 30 分間行い、各種 PTK の特異的な検出を行った。測定結果を次に示します。

細胞	処理	特異抗体 (量 / チューブ)	特異 PTK 活性 ( $\times 10^{-5}$ U/ $10^6$ cells)
A431	EGF	抗 EGFR* <sup>1</sup> (24 $\mu$ g)	763
A431	EGF	抗 c-Src* <sup>2</sup> (10 $\mu$ l)	100
A431	EGF	ノーマルマウス Ig (11 $\mu$ l)	検出限界以下
WiDr	無処理	抗 FAK* <sup>3</sup> (10 $\mu$ g)	79
WiDr	無処理	ノーマルウサギ Ig (10 $\mu$ l)	検出限界以下

\* 1：マウスモノクローナル抗体（製品コード M059；終売）

\* 2：ウサギ抗血清（Chemicon Code：AB1420）

\* 3：ウサギポリクローナル抗体（製品コード M135；終売）

## X. 注意

- 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- 本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

**テクニカルサポートライン**

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <https://www.takara-bio.co.jp>

---

**タカラバイオ株式会社**