連載企画

フロンティアーズ FRONTIERS

bioauxilium
BETTER TOOLS. REAL DISCOVERIES.
bioauxilium.com

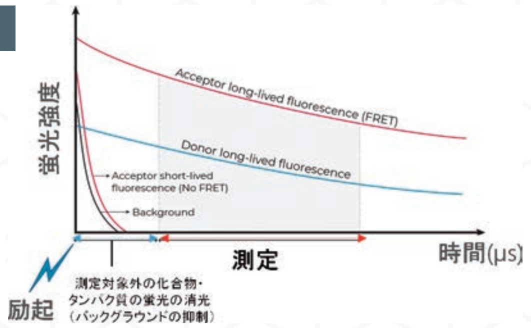
BioAuxilium 社は，改良型 Time-Resolved Förster Resonance Energy Transfer（TR-FRET）アッセイキットを提供しているカナダのメーカーで，PerkinElmer 社出身の研究者によって 2013 年に設立されました。
今回は，BioAuxilium 社が提供する TR-FRET 法を用いたリン酸化タンパク質検出キット THUNDER TR-FRET Cell Signaling Assay Kit についてお話を伺いました。

BioAuxilium 社では，医学生物学研究のための TR-FRET アッセイキットおよび試薬の開発，製造に注力しています。最近では，改良型 TR-FRET 法 THUNDER を開発し，68 種類の細胞シグナル伝達アッセイキットを発売しました。本キットは，細胞ライセート中の内因性リン酸化タンパク質や総タンパク質を，簡便・迅速・高感度に測定でき，基礎研究からハイスループットスクリーニングまで幅広くご利用いただけます。

TR-FRET 法とは？

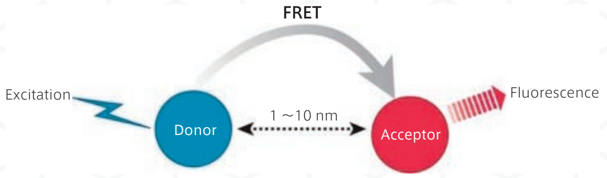
TR-FRET 法は，Time-Resolved Fluorescence : TRF 法（時間分解蛍光測定法）と FRET 法（蛍光共鳴エネルギー移動法）を組み合わせた測定方法で，タンパク質間相互作用の解析に用いられます。短時間かつ高感度で，洗浄・分離操作が不要であることから，ハイスループットの実験や基礎研究・薬理研究分野において ELISA や Western Blotting から代替可能な検出法として使用され始めています。

TRF 法



蛍光寿命が非常に長い蛍光物質ユウロピウムを用いて，化合物やタンパク質，アクセプターの蛍光が消光した後に，バックグラウンドを抑えて高感度に蛍光を測定できる手法。

FRET 法



FRET とは，2 つの蛍光体の間でエネルギーが転移する現象。ドナーの蛍光波長がアクセプターの励起波長に近く，両者が近接する場合（1～10 nm）に起こるため，分子間の相互作用や距離の研究に利用される。

THUNDER TR-FRET Cell Signaling Assay Kit の利点

Web ページ番号 69736 検索

最適なキットコンポーネント

- 慎重に検証された抗体ペア
- 最適なドナー／アクセプター蛍光色素分子
- 最適化された溶解バッファーを使用して標識抗体を検証

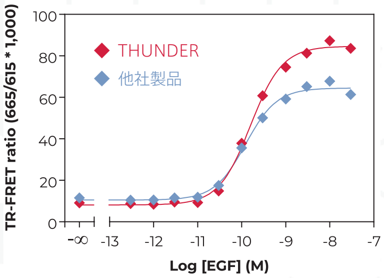
厳格な検証

- すべての製品は，パスウェイ特異的な活性／阻害物質で処理した細胞のライセートで検証されており，実際のアッセイ条件下で最適な性能を実証しています。
- テクニカルデータシートには検証データが含まれています。

■従来の TR-FRET と THUNDER の比較

方　法	従来の TR-FERT 法	THUNDER
S/B 比*	低い	高い
バリデーション	不完全	厳密
適切なポジティブコントロール	なし	あり
ロット間のばらつき	あり	前ロットと比較して検証
価格	高価	安価

＊Singal/Background 比＝アッセイ系の精度を表す指標



EGF 刺激による HEK293 細胞内のリン酸化 ERK1/2 の測定

特　長

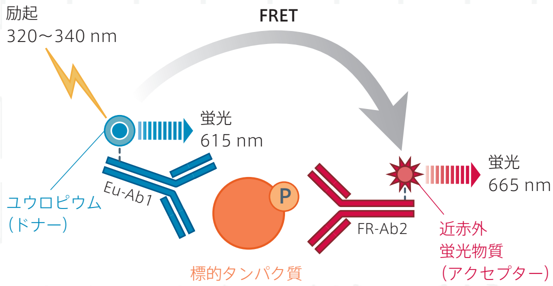
- バックグラウンドが低く，高 S/B 比，高感度
- 洗浄や分離操作不要
- 細胞ライセートに試薬を添加するのみの簡便な操作
- 費用対効果が高い
- シグナルが長時間安定
- 高い再現性
- 小規模スケール（100 assay）用もあり

キット内容

- ユウロピウム標識抗体
- 近赤外蛍光分子標識抗体
- Lysis buffer
- Detection buffer
- Positive control lysate

※別途，検出用プレート（96 well もしくは 384 well），TR-FRET の測定が可能なプレートリーダーなどが必要です。

原　理



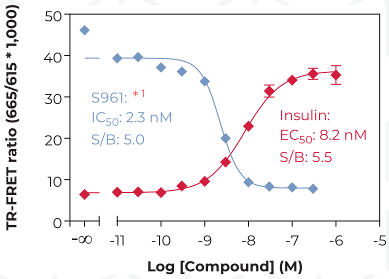
標的タンパク質に対するエピトープの異なる 2 種類の抗体に，蛍光寿命が非常に長い蛍光物質ユウロピウム（Eu）と近赤外の蛍光物質（far-red fluorophore : FR）がそれぞれ標識されている。2 種類の抗体は標的に結合することで近接し，ドナーの蛍光波長がアクセプターの励起波長に近い場合，ドナーからの光エネルギーを利用してアクセプターが蛍光を発する FRET 現象が生じるため，ドナーとアクセプターが近接した状態にあるかどうか判定できる。

測定可能な因子の種類

4EBP1	AKT pan	BAD	CREB
EGFR	eIF2α	eIF4E	ERK1/2
GAPDH	GSK3β	Insulin Receptor β	JNK1/2/3
MEK1	Met	NF-κβ	p38αβγ MAPK
p38α MAPK14	p53	p70 S6K	Ribosomal Protein S6
SLP-76	SMAD2	SRC	STAT3
STAT5	STAT6	—	—

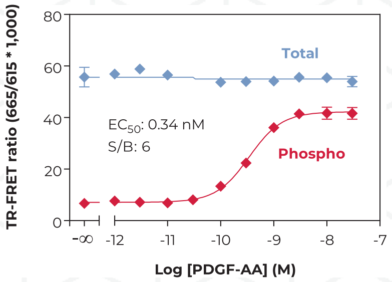
リン酸化タンパク質または総タンパク質を測定できるキットがあります。

アプリケーション例



B 細胞におけるリン酸化インスリンレセプター β（Y1150/Y1151）の測定

＊1 S961：インスリンレセプターに対するアンタゴニスト



PDGF で刺激した NIH3T3 細胞におけるリン酸化 AKT pan とトータル AKT pan の測定

ラインナップ

タイプ	アッセイ数	メーカー	商品コード＊2	包　装	価格（¥）
Phospho リン酸化された目的のタンパク質を測定できるキット	100	BAX	KIT-xxxxP-100	1 kit	53,000
	500	BAX	KIT-xxxxP-500	1 kit	166,000
Total 総タンパク質を測定できるキット	100	BAX	KIT-xxxxT-100	1 kit	53,000
	500	BAX	KIT-xxxxT-500	1 kit	166,000
Phospho＋Total Phospho，Total のセット	500 (400 Phospho＋100 Total)	BAX	KIT-xxxxPT-500	1 pack	180,000

＊2 xxxx は因子により異なります。各因子の商品コードは Web ページ番号：69736 の「製品ラインナップ」をご覧下さい。

※1 アッセイは 1 ウェル分に相当します。

今後の展望

THUNDER TR-FRET Cell Signaling Assay Kit は，すべての研究者が TR-FRET 技術を手軽に利用できる，手頃な価格のアッセイキットです。また，ELISA や他の TR-FRET アッセイキットに代わる費用対効果の高い製品です。細胞シグナル，分泌バイオマーカー，GPCR（cAMP），タンパク質間相互作用のアッセイキットもラインナップに追加する予定です。
必要なアッセイキットが見つからない場合は，独自の試薬やアッセイの開発を BioAuxilium 社がお手伝いします。抗体やタンパク質のカスタムラベル化や，お客様の仕様に合わせたアッセイ開発を行うことで，お客様の研究室で行える実験の幅を広げることができます。BioAuxilium 社ではどこよりも迅速なスピードで開発を行っています。

共同設立者の Jaime Padros 氏（左）と Mireille Caron 氏（右）