Glutamine Assay Kit-WST

Technical Manual

はじめに

グルタミンは、TCA サイクルの中間体である α- ケトグルタル酸の供給源であり、核酸やその他のアミノ酸合成およびエネルギー産生に利用される重要な物質です。特にがん細胞では、グルタミンを基質に、α- ケトグルタル酸を供給する経路である「グルタミノリシス」が亢進しており、グルタミノリシスは活性酸素種の消去や、酸化型グルタチオンの還元といったことに大きく寄与しているということが報告されています [1)]。

Glutamine Assay Kit-WST は、エネルギー代謝基質であるグルタミンを定量するキットです。細胞培養液中あるいは細胞内のグルタミンは、WST の還元反応により定量することができ、グルタミンの定量下限は 5 μmol/l です。また、96 穴マイクロプレートに対応しているため、多検体測定が可能です。

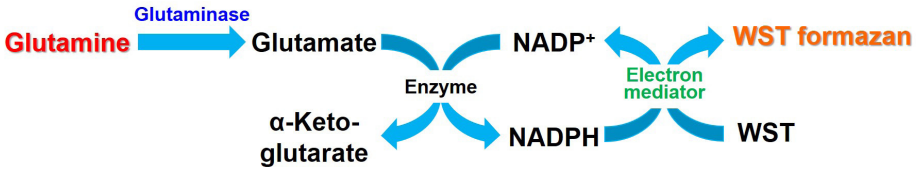


図 1　Glutamine Assay Kit-WST の測定原理

キット内容

Dye Mixture	×1
Glutamine Standard (赤キャップ)	×1
Enzyme (緑キャップ)	×1
Glutaminase (黄キャップ)	20 μl×1
Reconstitution Buffer (白キャップ)	750 μl×1
Reaction Buffer	5 ml×1
Assay Buffer	7.5 ml×1
Lysis Buffer	25 ml×1
Filtration Tube	×12

※キット付属の Filtration Tube は、細胞内グルタミンを定量する場合に使用します。本キットでは、n=3 の測定で標準サンプル 8 点と測定用サンプル 12 サンプル分の測定が可能です。そのため、Filtration Tube は 12 サンプル分を同梱しております。12 サンプル以上の測定試料を調製する際は、別途 Filtration Tube (ナノセップ遠心ろ過デバイス (10K)([OD010C33]、PALL 社)) をご準備頂く必要があります。

保存条件

0−5 ℃ で保存して下さい。

必要なもの（キット以外）

ープレートリーダー (450 nm の吸光フィルター)
ー 96 穴マイクロプレート
ーインキュベーター (37 ℃)
ー 20−200 μl のマルチチャンネルピペット
ー 100−1000 μl、20−200 μl、2−20 μl マイクロピペット
ー PBS
ーコニカルチューブ

使用上のご注意

・キットの中の試薬は、室温に戻してからご使用下さい。
・輸送中の振動等により、内容物がスクリューキャップマイクロチューブ壁面やキャップ裏面に付着している場合がありますので、内容物を底面に落とした後に開封して下さい。
・Glutaminase は酵素懸濁液です。静置しておくと酵素が沈殿しますので、ピペッティングにより均一な懸濁液にしてご使用下さい。
・正確な測定値を得るために、1 つの測定試料につき複数 (n=3 以上) のウェルを使用下さい。
・Working solution をサンプルに加えると直ちに発色が始まります。各ウェル間のタイムラグによる測定誤差を少なくするためにマルチチャンネルピペットをご使用下さい。
・測定試料は、検量線範囲内に入るように希釈し、測定に用いて下さい。
・本キットにはガラス製容器およびアルミ製シールキャップを使用しております。取扱いに際しては、保護手袋を着用して下さい。
・本品は細胞培養上清中および細胞内のグルタミンの定量に最適化されています。細胞内グルタミン濃度を測定する場合、細胞溶解液の調製および Glutamine standard solution の調製にはキット付属の Lysis Buffer をご使用下さい。また、細胞溶解液は Filtration Tube にて除タンパク処理したものを測定に用いて下さい。

溶液調製

Dye Mixture stock solution の調製

Dye Mixture のバイアル瓶に Reconstitution Buffer を全量加えて溶解する。
※ Dye Mixture stock solution は Reconstitution Buffer が入っていた瓶に移し、遮光下、冷蔵保存 (0−5 ℃) して下さい (2 ヶ月間安定)。

Enzyme stock solution の調製

Enzyme に PBS 120 μl を加え、ピペッティングにより溶解する。
※内容物がチューブ底面から外れ、チューブ壁面やキャップ裏面に付着している場合があります。内容物を底面に落とした後に開封して下さい。
※ Enzyme stock solution は氷浴上で使用し、溶解後は冷蔵保存 (0−5 ℃) して下さい (2 ヶ月間安定)。

Glutamine Standard stock solution (10 mmol/l) の調製

Glutamine Standard に超純水 300 μl を加え、ピペッティングにより溶解する。
※内容物がチューブ底面から外れ、チューブ壁面やキャップ裏面に付着している場合があります。内容物を底面に落とした後に開封して下さい。
※ Glutamine Standard stock solution は氷浴上で使用し、溶解後は冷蔵保存 (0−5 ℃) して下さい (2 ヶ月間安定)。

Glutaminase solution の調製

Glutaminase を Reaction Buffer で希釈する。
※ Glutaminase solution は、表 1 をご参照の上、調製して下さい。

	24 well 分	48 well 分	96 well 分
Reaction Buffer	550 μl	1100 μl	2200 μl
Glutaminase	2.5 μl	5 μl	10 μl

表 1　Glutaminase solution 調製例

Working solution の調製

(1) コニカルチューブに Dye Mixture stock solution を加え、Assay Buffer で希釈する。
(2) 操作 (1) で調製した溶液に Enzyme stock solution を加える。
※ Working solution は、表 2 をご参照の上、調製して下さい。
※ Working solution は光に不安定であるため、使用直前に調製し、調製後はアルミホイルで覆うなどして遮光して下さい。
また、調製後の Working solution は保存できません。その日のうちにお使い下さい。

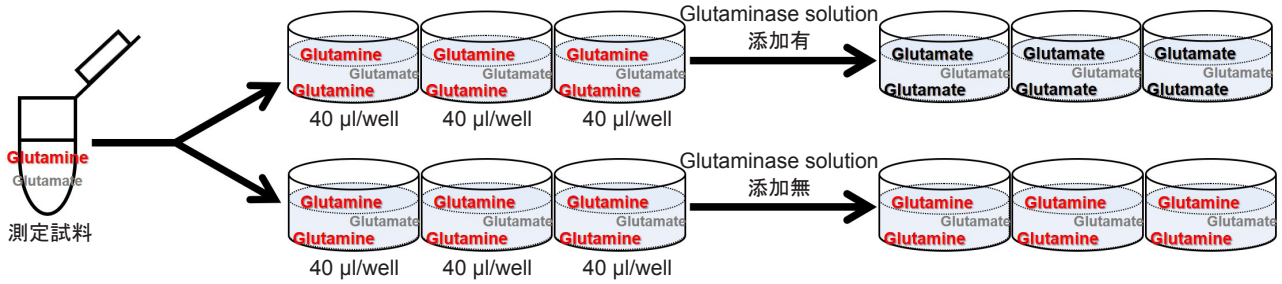
	24 well 分	48 well 分	96 well 分
Dye Mixture stock solution	175 µl	350 µl	700 µl
Assay Buffer	1575 µl	3150 µl	6300 µl
Enzyme stock solution	24.5 µl	49 µl	98 µl

表 2　Working solution 調製例

操作

1. 測定用サンプルの調製

Glutamine Assay Kit-WST を用いたサンプル中グルタミン濃度の定量方法は、図 2 に示す通りです。測定用サンプル量は n=3 で測定する場合、Glutaminase solution を添加する分 (40 µl×3 ウェル) と、Glutaminase solution を添加しない分 (40 µl×3 ウェル) の計 6 ウェル分が必要となります。



サンプル中グルタミン濃度 (mmol/l) ＝ (Glutaminase solution 添加有) － (Glutaminase solution 添加無)

図 2　Glutamine Assay Kit-WST を用いたグルタミンの検出方法

－細胞培養上清中グルタミン定量用サンプルの調製－

細胞培養上清測定試料を準備する (Sample)。
※測定試料は、検量線範囲内 (0－0.5 mmol/l) に入るように超純水で希釈し、測定に用いて下さい。
※測定試料は n=3 で測定する場合、合計 240 µl 以上は必要です (1 ウェルあたり 40 µl×6 ウェル分)。

－細胞内グルタミン定量用サンプルの調製－

(1) 細胞 (5－10×10^5 cells) を 1.5 ml マイクロチューブに準備する。
(2) 300×*g* で 5 分間遠心し、上清を除去する。
(3) PBS 500 µl を加え、ピペッティングにより懸濁後、300×*g* で 5 分間遠心し、上清を除去する。
(4) Lysis Buffer 400 µl を加え、ピペッティングにより細胞を溶解した後、12,000×*g* で 5 分間遠心する。
(5) 上清 350 µl を Filtration Tube に移し、12,000×*g* で 10 分間遠心する。
※測定用サンプルは n=3 で測定する場合、合計 240 µl 以上は必要です (1 ウェルあたり 40 µl×6 ウェル分)。
※遠心後の濾液が 240 µl 以上ない場合は、遠心時間を延長して下さい。
(6) 操作 (5) で得られた濾液を測定に用いる (Sample)。
※測定試料は、検量線範囲内 (0－0.5 mmol/l) に入るように Lysis Buffer で希釈し、測定に用いて下さい。

2. Glutamine standard solution の調製

10 mmol/l Glutamine Standard stock solution 50 µl を超純水 950 µl で希釈し、0.5 mmol/l Glutamine standard solution を調製する。
さらに順次 2 倍希釈していき、標準液 (0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0313, 0.0157, 0.00785, 0 mmol/l) とする (図 3 参照)。
※細胞溶解溶液中のグルタミン濃度を測定する場合、超純水の代わりに、Lysis Buffer を Glutamine standard solution の調製にご使用下さい。

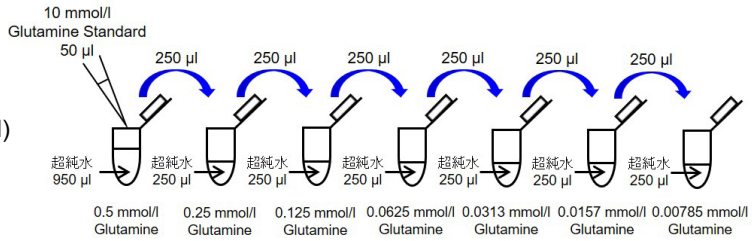


図 3　Glutamine standard solution の調製方法

3. 測定

(1) Glutamine standard solution および Sample を 40 µl ずつ、各ウェルに入れる (図 4 参照)。
※正確な測定値を得るために、1 つの測定試料につき複数 (n=3 以上) のウェルをご使用下さい。
(2) Glutaminase solution 20 µl を、Glutamine standard solution および Sample (Glutaminase solution 添加有) の各ウェルに入れる。
(3) Sample (Glutaminase solution 添加無) の各ウェルに、Reaction Buffer 20 µl を入れる。
(4) 37°C で 15 分間インキュベートする。
※インキュベートする際は、溶液の揮発を防ぐため、マイクロプレート用シール等をご使用下さい。
(5) Working solution 60 µl を各ウェルに入れる。
※ Working solution を加えると直ちに発色が始まります。各ウェル間のタイムラグを少なくするためにマルチチャンネルピペットをご使用下さい。
(6) 37 °C で 30 分間インキュベートする。
※インキュベートする際は、溶液の揮発を防ぐため、マイクロプレート用シール等をご使用下さい。
(7) プレートリーダーを用いて 450 nm の吸光度を測定する。
(8) 測定試料 (Sample) 中のグルタミン濃度を検量線より求める。
※測定試料中のグルタミン濃度は以下の計算式より算出します。
グルタミン濃度 (mmol/l) ＝ (Glutaminase solution 添加有) － (Glutaminase solution 添加無)
※これにより求められた値は、調製した測定試料溶液中の濃度です。希釈前の試料中に含まれる濃度は、得られた測定値と試料の希釈倍率より算出して下さい。

	1 2 3	4 5 6
A	0 mmol/l Glutamine	Sample 1 (Glutaminase solution添加有)
B	0.00785 mmol/l Glutamine	Sample 1 (Glutaminase solution添加無)
C	0.0157 mmol/l Glutamine	Sample 2 (Glutaminase solution添加有)
D	0.0313 mmol/l Glutamine	Sample 2 (Glutaminase solution添加無)
E	0.0625 mmol/l Glutamine	Sample 3 (Glutaminase solution添加有)
F	0.125 mmol/l Glutamine	Sample 3 (Glutaminase solution添加無)
G	0.25 mmol/l Glutamine	Sample 4 (Glutaminase solution添加有)
H	0.5 mmol/l Glutamine	Sample 4 (Glutaminase solution添加無)

図 4　Glutamine standard solution とサンプルのプレートレイアウト例 (n=3)

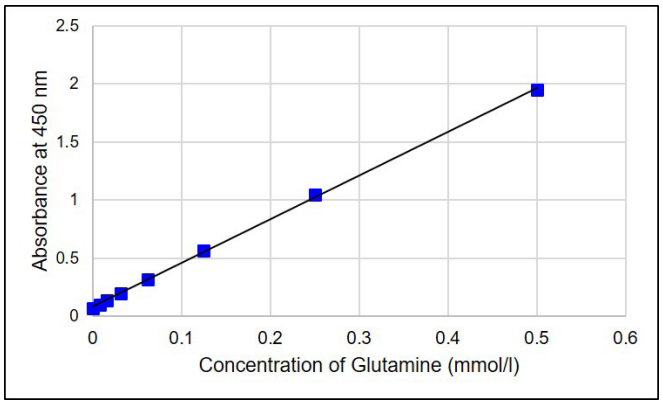


図 5　Glutamine 検量線の例

実験例

Doxorubicin 処理により老化誘導した A549 細胞のグルタミン消費量評価

(1) A549 細胞 (2×10^7 cells/dish、10% fetal bovine serum、1% penicillin-streptomycin を含む DMEM 培地) を 10 cm ディッシュに播種し、37°C、5%CO_2 インキュベーターで一晩培養した。
(2) 培地を吸引除去し、DMEM 培地で希釈した 200 nmol/l の Doxorubicin 溶液 10 ml を加え、37°C、5%CO_2 インキュベーターで 2 日間培養した。
(3) 培地を吸引除去し、PBS 2 ml で 1 回洗浄した。
(4) トリプシン処理により細胞を剥がした後、DMEM 培地でコニカルチューブに回収した。
(5) Doxorubicin 処理あり、なしの A549 細胞をそれぞれ 6 穴プレートに播種 (1×10^6 cells/well、10% fetal bovine serum、1% penicillin-streptomycin を含む DMEM 培地) し、37°C、5%CO_2 インキュベーターで一晩培養した。
(6) 培地を吸引除去し、2 mmol/l グルタミンを含む DMEM 培地 2 ml を加え、37°C、5%CO_2 インキュベーターで一晩培養した。
(7) 1.5 ml マイクロチューブに細胞培養上清を 100 µl 取り、超純水で 15 倍希釈したものを調製した。
※グルタミン消費量を求めるため、2 mmol/l グルタミンを含む DMEM 培地のみを超純水で 15 倍希釈したものも測定試料とした。
(8) Glutamine standard solution を調製し、標準液を調製した (Glutamine standard solution の調製参照)。
(9) 調製した測定試料 (DMEM 培地のみ、doxorubicin 処理あり、なしの細胞培養上清) および Glutamine standard solution を 40 µl ずつ、96 穴マイクロプレートに入れた。
(10) 調製した Glutaminase solution 20 µl を、Glutamine standard solution およびサンプル (Glutaminase solution 添加有) の各ウェルに加えた。
(11) Glutaminase solution 添加無のサンプルの各ウェルには、Reaction Buffer 20 µl を加えた。
(12) 37°C で 15 分間インキュベートした。
(13) 調製した Working solution 60 µl を各ウェルに加えた。
(14) 37°C で 30 分間インキュベートした。
(15) プレートリーダーを用いて 450 nm の吸光度を測定し、測定試料中グルタミン濃度を検量線より求めた。
測定試料中のグルタミン濃度は以下の計算式より算出した。

グルタミン濃度 (mmol/l) ＝ (Glutaminase solution 添加有) － (Glutaminase solution 添加無)

また、細胞 (10^4 cells) あたりのグルタミン消費量については、以下の計算式より算出した。

$$\text{グルタミン消費量 (nmol/10}^4\text{ cells)} = \frac{\text{(DMEM 培地中グルタミン量 (nmol)) － (doxorubicin 処理ありまたはなし培養上清中グルタミン量 (nmol))}}{\text{細胞数}}$$

※グルタミン消費量 (nmol) ＝ (算出したグルタミン濃度 (mmol/l))×(6 穴プレートに添加した培地量 (2 ml))

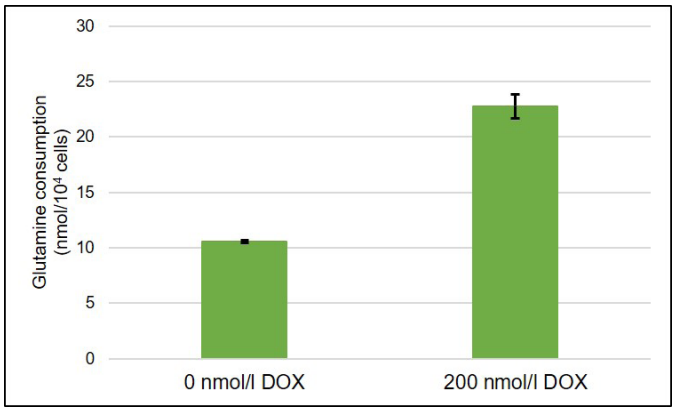


図 6　Doxorubicin(DOX) 処理により老化誘導した A549 細胞のグルタミン消費量評価

Doxorubicin 処理により、A549 細胞の細胞培養上清中グルタミン消費量は増加することを確認した。

参考文献

1) Lingtao, J. et al., *Cancer Cell*, **2015**, *27*, 257-270.

本製品は試験・研究用途です。臨床診断用途には使用できません。
ご質問・ご要望は下記までお問い合わせください。

DOJINDO 株式会社同仁化学研究所
熊本県上益城郡益城町田原 2025-5
熊本テクノリサーチパーク　〒 861-2202
Tel :096-286-1515 （ 代表 ）　Fax:096-286-1525
E-mail: info@dojindo.co.jp　URL: www.dojindo.co.jp

ドージン・イースト (東京)
東京都港区芝大門 2-1-17 朝川ビル 7F　〒 105-0012
Tel: 03-3578-9651 (代表)　Fax: 03-3578-9650
フリーダイヤル :0120-489548
フリーファックス :0120-021557