

はじめに

グルタミン酸は、タンパク質やグルタチオンの生合成に利用されているだけでなく、神経伝達物質としても重要な働きをしており、グルタミン酸が過剰に存在することは、アルツハイマー病などの神経変性疾患の原因となると考えられています。また近年では、シスチンを取り込み、グルタミン酸を放出するシスチン/グルタミン酸トランスポーター (xCT) を阻害すると、鉄依存性細胞死であるフェロトーシスが誘導されるといったことが報告されており、xCT を標的としたがん研究も行われています^{1), 2)}。

Glutamate Assay Kit-WST は、代謝産物であるグルタミン酸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酸は、WST の還元反応により定量することができ、グルタミン酸の定量下限値は 5 $\mu\text{mol/l}$ 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。

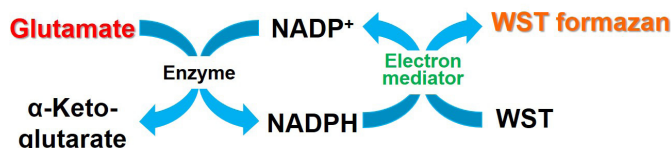


図 1 Glutamate Assay Kit-WST の測定原理

キット内容

Dye Mixture	×1
Glutamate Standard (10 mmol/l) (赤キャップ)	300 μl ×1
Enzyme (緑キャップ)	×1
Reconstitution Buffer (白キャップ)	750 μl ×1
Assay Buffer	7.5 ml ×1
Lysis Buffer	25 ml ×1
Filtration Tube	×24

※キット付属の Filtration Tube は、細胞内グルタミン酸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 24 サンプル分の測定が可能です。そのため、Filtration Tube は 24 サンプル分を同梱しております。24 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 °C で保存して下さい。

必要なもの
(キット以外)

- プレートリーダー (450 nm の吸光フィルター)
- 96 穴マイクロプレート
- インキュベーター (37 °C)
- 20-200 μl のマルチチャンネルピペット
- 100-1000 μl 、20-200 μl マイクロピペット
- PBS
- 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、内容物がスクリュウ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。
- 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酸の定量に最適化されています。細胞内グルタミン酸濃度を測定する場合、細胞溶解液の調製および Glutamate 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 °C) 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 °C) して下さい (2 ヶ月間安定)。

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 1 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 1 Working solution 調製例

1. 測定用サンプルの調製

—細胞培養上清中グルタミン酸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 1 ウェルあたり 40 μ l が必要です。

—細胞内グルタミン酸定量用サンプルの調製—

(1) 細胞 (5–10 \times 10⁵ cells) を 1.5 ml マイクロチューブに準備する。

(2) 300 \times g で 5 分間遠心し、上清を除去する。

(3) PBS 500 μ l を加え、ピペッティングにより懸濁後、300 \times g で 5 分間遠心し、上清を除去する。

(4) Lysis Buffer 300 μ l を加え、ピペッティングにより細胞を溶解した後、12,000 \times g で 5 分間遠心する。

(5) 上清 250 μ l を Filtration Tube に移し、12,000 \times 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 120 μ l 以上は必要です (1 ウェルあたり 40 μ l)。

※遠心後の濾液が 120 μ l 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. Glutamate standard solution の調製

10 mmol/l Glutamate Standard 50 μ l を超純水 950 μ l で希釈し、0.5 mmol/l Glutamate 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 2 参照)。

※細胞溶解溶液中のグルタミン酸濃度を測定する場合、超純水の代わりに、Lysis Buffer を Glutamate standard solution の調製にご使用下さい。

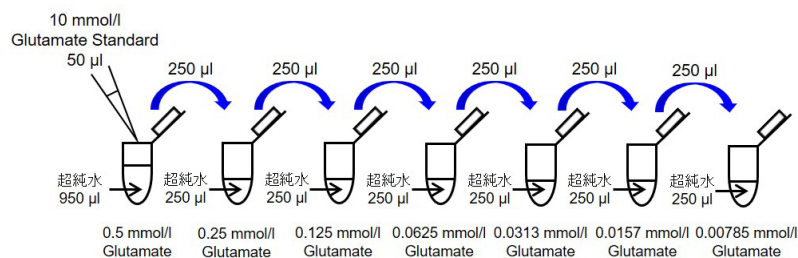


図 2 Glutamate standard solution の調製方法

3. 測定

(1) Glutamate standard solution および Sample を 40 μ l ずつ、各ウェルに入れる (図 3 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) Working solution 60 μ l 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。

(3) 37 $^{\circ}$ 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。

(4) プレートリーダーを用いて 450 nm の吸光度を測定する。

(5) 測定試料 (Sample) 中のグルタミン酸濃度を検量線より求める。

※これにより求められた値は、調製した測定試料溶液中のグルタミン酸濃度です。希釈前の試料に含まれるグルタミン酸濃度は、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 Glutamate			Sample 1		
B	0.00785 mmol/l Glutamate			Sample 2		
C	0.0157 mmol/l Glutamate			Sample 3		
D	0.0313 mmol/l Glutamate			Sample 4		
E	0.0625 mmol/l Glutamate			Sample 5		
F	0.125 mmol/l Glutamate			Sample 6		
G	0.25 mmol/l Glutamate			Sample 7		
H	0.5 mmol/l Glutamate			Sample 8		

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

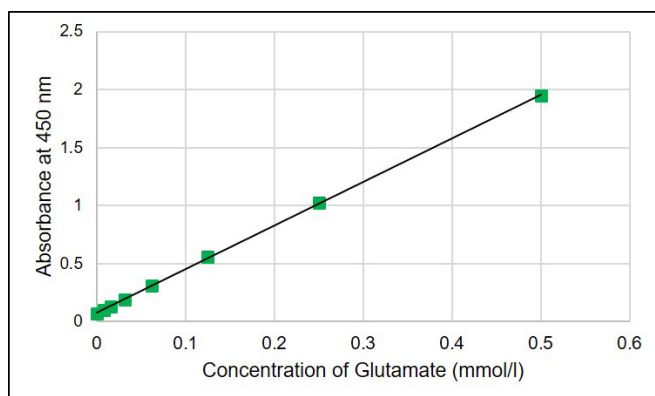


図 4 Glutamate 検量線の例

Erastin によるシスチン/グルタミン酸交換輸送体阻害評価

- (1) A549 細胞 (1×10^6 cells/well、10% fetal bovine serum、1% penicillin-streptomycin を含む DMEM 培地) を 6 穴プレートに播種し、37°C、5%CO₂ 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 培地で目的の濃度に調製した Erastin 溶液 2 ml を加え、37°C、5%CO₂ インキュベーターで一晩培養した。
- (3) 1.5 ml マイクロチューブに細胞培養上清を 100 μ l 取り、超純水で 15 倍希釈したものを調製した。
- (4) Glutamate standard solution を調製し、標準液を調製した (Glutamate standard solution の調製参照)。
- (5) 調製した測定試料および Glutamate standard solution を 40 μ l ずつ、96 穴マイクロプレートに入れた。
- (6) 調製した Working solution 60 μ l を各ウェルに加えた。
- (7) 37°C で 30 分間インキュベートした。
- (8) 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酸濃度を検量線より求めた。

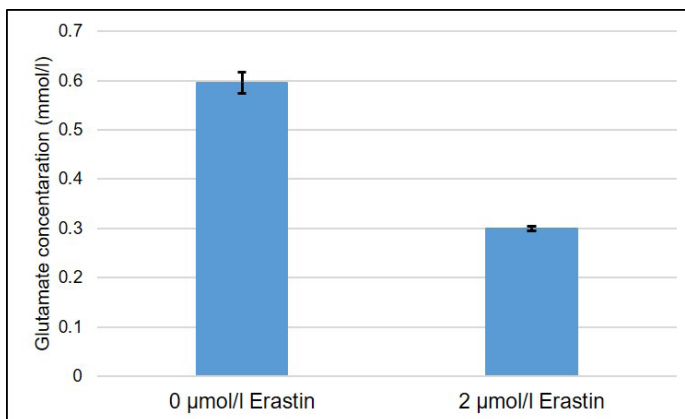


図 5 Erastin によるシスチン/グルタミン酸交換輸送体阻害評価

シスチン/グルタミン酸交換輸送体阻害剤である Erastin 処理により、培地中に放出されるグルタミン酸は減少することを確認した。

参考文献

- 1) Cobler, L. et al., *Oncotarget*, **2018**, 9, 32280-32297.
- 2) Tobias, M. et al., *Free Radical Biology and Medicine*, **2019**, 133, 144-152.

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