

NanoBiT™ Protein:Protein Interaction System

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS N2011, N2012, N2013, N2014, N2015 and N2016

この Quick Protocol は TM461 を基に作成された簡易型のプロトコルです。
最新、詳細なプロトコルについては www.promega.com/protocols/ をご覧ください。

<試薬の準備 : Nano-Glo® Live Cell Reagent の調製> (用事調製)

1. (初めて使用する場合) Nano-Glo® LCS Dilution Buffer を室温に戻す。
2. Nano-Glo® Live Cell Substrate を -20°C から取り出し、軽くタッピングし、混ぜる。Nano-Glo® Live Cell Substrate がチューブのフタや側面についている場合には軽く遠心して溶液をチューブの底に集める。
3. Nano-Glo® LCS Dilution Buffer を用いて、Nano-Glo® Live Cell Substrate を 20 倍希釈し、これを 5X Nano-Glo® Live Cell Reagent とする。

(例. 19mL の Nano-Glo® LCS Dilution Buffer に 1mL の Nano-Glo® Live Cell Substrate を加えて、20mL の Nano-Glo® Live Cell Reagent とする)

* Nano-Glo® LCS Dilution Buffer は融解後、室温にて保管可能です。

<アッセイプロトコル>

A. Nano-Glo® Live Cell Reagent の添加後に、化合物を加える場合

1. 添加する化合物を 13.5X となるように緩衝能のある培地(HEPES 添加済みの培地、Opti-MEM など)で希釈する。
2. 96well plate の各 well から培地を除き、緩衝能のある新しい培地を 100 μL 加える。
3. 25 μL の Nano-Glo® Live Cell Reagent を加え、96well plate を手動もしくはプレートシェーカー (300–500rpm、15 秒)にてゆっくりと攪拌する。
4. ルミノメーターで発光を測定(integration time: 0.5-2sec)。ベースラインとなる発光値を確認する。
5. 10 μL の 13.5X 化合物もしくは Vehicle control となる溶液を各 well に加え、手動もしくはプレートシェーカー(300–500rpm、15 秒)にてゆっくりと攪拌する。
6. 最大 2 時間までの任意の時間まで発光を測定する。(integration time: 0.5-2sec)

B. 化合物の添加後に、Nano-Glo® Live Cell Reagent を添加する場合

1. 添加する化合物を 11X となるように緩衝能のある培地(HEPES 添加済みの培地、Opti-MEM® など)で希釈する。
2. 96well plate の各 well から培地を除き、緩衝能のある新しい培地を 100 μL 加える。
3. 10 μL の 11X 化合物もしくは Vehicle control となる溶液を各 well に加え、手動もしくはプレートシェーカー(300–500rpm、15 秒)にてゆっくりと攪拌する。
4. 25 μL の Nano-Glo® Live Cell Reagent を加え、96well plate を手動もしくはプレートシェーカー (300–500rpm、15 秒)にてゆっくりと攪拌する。
5. 最大 2 時間までの任意の時間で、発光測定を行う。(integration time: 0.5-2sec)

* 化合物処理なしでの PPI による発光シグナルを検出する場合にはアッセイプロトコル B. をまずご検討ください。

<モデルプロトコル 1>

FRB-LgBiT・FKBP-SmBiT を用いた PPI 発光シグナルの検出

用意するもの：

- ・ HEK293 細胞
- ・ Opti-MEM I Medium もしくは HEPES 添加済みの培地
- ・ 細胞培養用の 96well 白クリアボトムプレートもしくはソリッドプレート(参考：Corning, Cat. #3917(ソリッド)または Cat. #3610(クリアボトム))
- ・ Transfection reagent (参考：FuGENE® HD Transfection Reagent, Cat. # E2311 もしくは ViaFect™ Transfection Reagent, Cat. # E4981)
- ・ NanoBiT™ PPI Control Pair (FKBP, FRB) (Cat. #N2016)
- ・ Nano-Glo® Live Cell Assay System (Cat. #N2011)
- ・ Rapamycin (参考：Selleck, Cat. # S1039, Sigma, Cat. # R8781, R0395 など)

Day1: HEK293 細胞の播種

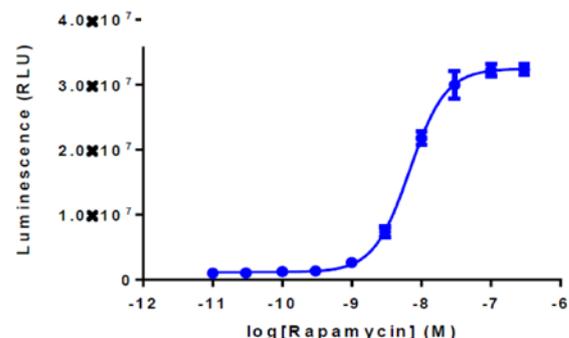
1. HEK 293 細胞をアッセイ前まで培養する。
2. トリプシン処理等で細胞を剥がし、細胞懸濁液を 96-well plate に 100μL ずつ、10,000cell/well となるように播種する。
3. 37 °C CO2 インキュベーターで一晩培養する。

Day2: トランスフェクション

1. Opti-MEM I Medium を用いて、LgBiT vector / SmBiT vector の DNA 溶液 (各 6.25ng/μL) を調製する。
2. トランスフェクション試薬を用いて、LgBiT vector / SmBiT vector を導入する。
(条件例) FuGENE® HD or ViaFect™ 0.3μL + LgBiT/SmBiT の DNA 溶液 (各 6.25ng/μL) 8μL
3. 37 °C CO2 インキュベーターで一晩培養する。

Day 3: Rapamycin 処理および PPI 発光シグナルの測定

1. 培地を除き、Opti-MEM I Medium もしくは HEPES 添加済みの培地 100uL に交換する。(FBS は 0~10%の範囲で添加することが可能です)
2. Rapamycin を終濃度 13.5X となるように Opti-MEM I Medium で希釈する。また、同様に Vehicle Control solution も作製する。
3. 10μL の 13.5X Rapamycin solution もしくは Vehicle Control を各 well に加える。
4. 25μl NanoBiT Nano-Glo® Live Cell Reagent を各 well に加え、プレートシェーカー(300–500rpm、15 秒)にてゆっくりと攪拌する。
5. 最大 2 時間までの任意の時間で、発光測定を行う。
6. Rapamycin の添加による PPI の変動を EXCEL など解析する(例. 右図)



<モデルプロトコル 2>

LgBiT-PRKAR2A・SmBiT-PRKACA を用いた PPI 発光シグナルの検出

用意するもの：

- ・ HEK293 細胞
- ・ Opti-MEM I Medium もしくは HEPES 添加済みの培地
- ・ 細胞培養用の 96well 白クリアボトムプレートもしくはソリッドプレート(参考：Corning, Cat. #3917(ソリッド)または Cat. #3610(クリアボトム))
- ・ Transfection reagent (参考：FuGENE® HD Transfection Reagent, Cat. # E2311 もしくは ViaFect™ Transfection Reagent, Cat. # E4981)
- ・ NanoBiT™ PPI MCS Starter System(Cat. #N2014)もしくは NanoBiT™ PPI Flexi® Starter System(Cat. #N2015)

Day1: HEK293 細胞の播種

1. HEK 293 細胞をアッセイ前まで培養する。
2. トリプシン処理等で細胞を剥がし、細胞懸濁液を 96-well plate に 100 μ L ずつ、10,000cell/well と なるように播種する。
3. 37 °C CO₂ インキュベーターで一晩培養する。

Day2: トランスフェクション

1. Opti-MEM I Medium を用いて、下記の 3 つの DNA 溶液 (各 6.25ng/ μ L) をそれぞれ調製する。
 - ・ LgBiT vector / SmBiT vector
 - ・ LgBiT vector / NanoBiT™ Negative Control Vector (HaloTag®-SmBiT)
 - ・ NanoBiT™ Negative Control Vector (HaloTag®-SmBiT)
2. トランスフェクション試薬を用いて、各 DNA を導入する。
(条件例) FuGENE® HD or ViaFect™ 0.3 μ L + LgBiT/SmBiT の DNA 溶液 (各 6.25ng/ μ L) 8 μ L
3. 37 °C CO₂ インキュベーターで一晩培養する。

Day 3: PPI 発光シグナルの測定

1. 培地を除き、Opti-MEM I Medium もしくは HEPES 添加済みの培地 100 μ L に交換する。
(FBS は 0~10%の範囲で添加することが可能です)
2. 25 μ L NanoBiT Nano-Glo® Live Cell Reagent を各 well に加え、プレートシェーカー(300–500 rpm、15 秒)にてゆっくりと攪拌する。
3. 最大 2 時間までの任意の時間で、発光測定を行う。
4. PPI による発光シグナルを EXCEL など で解析する(例. 右図)

