

α - Synuclein Aggregation Assay Kit

Cat. No. CSR-SYN01

Updated on Nov. 10th, 2021

※ This product is manufactured under license from Takashi Nonaka, Ph.D. and Masato Hasegawa, Ph.D. of Department of Dementia and Higher Brain Function, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science.

www.cosmobiousa.com

【 I 】 Introduction

Dementia is a disease that causes memory and judgement loss, there is no fundamental treatment developed for it. Years of scientific research has proven that protein aggregation occurs in the degeneration part of the brain for many neurodegenerative diseases including dementia, indicating appearance of this aggregation is closely related to these diseases development and progression.

Aggregation occurs when normal protein forms abnormal structure for particular reasons and accumulates in the cell, which each disease has different aggregating protein. It is known that protein called " α -Synuclein" forms abnormal structure in Parkinson Disease / Lewy Body Dementia / Multiple system atrophy patient brain.

α -Synuclein Aggregation Assay Kit mimics intracellular aggregation of " α -Synuclein", which allows in vitro screening of active ingredients.

【 II -1】 Kit Components

- α -Synuclein Aggregation Assay Kit can be used up to 300 wells (24 well plate size) when prepared as described in 【III-2】 (page 2).
- Plasmid vectors of α -Synuclein Aggregation Assay Kit are generated by DNA2.0 (www.dna20.com/).

Components	Volume	Quantity	Storage temperature	Precautions
pCMV-SNCA (α -Synuclein Expression plasmid vector, Red cap)	32 μ L (conc. 1.25 μ g/ μ L)	1 vial	4°C (After thawing)	Use appropriate protective equipment (such as gloves and glasses) when handling. (The purchaser should not transfer and/or resell copies and/or derivatives of this product to any third parties.)
pCMV-NC(Negative control vector, Green cap)	5 μ L (conc. 1.25 μ g/ μ L)	1 vial		
pCMV-dGFP (dGFP Expression plasmid vector, Blue cap)	5 μ L (conc. 1.25 μ g/ μ L)	1 vial		
20 mM Tris-HCl Buffer (pH7.4)	10 mL	1 bottle		Use appropriate protective equipment (such as gloves and glasses) when handling. Keep in a cool dark place once unpacked.
F- α Syn (α -Synuclein Fibrils, Yellow cap)	32 μ L (conc. 1 μ g/ μ L)	1 vial	-80°C	After thawing, it is stable for at least 1 month when store at 15-30°C in shaded condition. below -80° C for prolonged storage. It should be divided into small quantity to avoid freezing and thawing. Prior to disposing F- α Syn, please autoclave (134°C , 20 min.), or add SDS (>3%) prior to autoclave (121°C , 20min.). If above condition cannot be matched, please dispose accordingly to your local rules and regulations.
Multifectam (Gene transfection reagent)	0.33 mg	1 bottle	4°C (After thawing)	Although label of the bottle describes "store at -20 °C ", lyophilized powder before reconstitution keeps stable also at 4 °C and possible to store, After reconstitution, store solution at 4°C or frozen condition.

For research use only, Not for diagnostic use.
Please read this manual thoroughly before use.

【II -2】 Required but not provided:

- SH-SY5Y cell line
- Culture medium (recommended: DE/F-12, 10% FBS, 1% NEAA)
- Opti-MEM® or Serum-Free medium (e.g. ThermoFisher Scientific, cat. no. 31985062)
- DNase, RNase-Free sterile purified water

* Please perform steps III -1 through III -3 under germless condition in clean bench.

【III -1】 Preparation of working solution

- pCMV-SNCA (α - Synuclein Expression plasmid vector, Red cap), pCMV-NC (Negative control vector, Green cap) , pCMV-dGFP (dGFP Expression plasmid vector, Blue cap)

Please adjust concentration with sterile purified water based on your amount needs (just before use).
e.g. 1uL/well of 10 fold dilution when used for 24 well plate size.

- F- α Syn (α - Synuclein Fibrils, Yellow cap)

Please adjust concentration with sterile purified water based on your amount needs (just before use).
e.g. 1uL/well of 10 fold dilution when used for 24 well plate size.

* CAUTION: Prior to disposing F- α Syn, please autoclave (134 °C , 20 min.), or add SDS (>3%) prior to autoclave (121 °C , 20min.). If above condition cannot be matched, please dispose accordingly to your local rules and regulations.

- MultiFectam (Gene transfection reagent)

Add 1mL of sterile purified water (room temp.) to MultiFectam and let it sit still for c.a. 10sec., vortex thoroughly. Reagent can be used up to 3 months (4 °C) or 6 months (-20 °C) following reconstitution. Performance of MultiFectam after reconstitution is guaranteed up to 6 times of freeze-thaw cycle; to prevent it below 6 times or less, please aliquot reconstituted reagent into multiple vials.

【III -2】 How to use the kit

- Below example is for use of SH-SY5Y cell line.
- For the 1st try out or when using other cell lines, please perform preliminary experiment by adjusting usage amount of pCMV-dGFP plasmids based on below protocol.

- 1 Culture necessary cell amount for preliminary experiment.
- 2 Plate 3×10^4 cells/cm² into each multi-well plate.
- 3 When cells becomes confluent (typically 1-3 days depends on cell line and culture medium conditions), follow methods in below 【III-3】 to adjust pCMV-SNCA and F- α Syn concentration to add into medium.
- 4 Incubate 4 hours, replace with culture medium.
- 5 α - Synuclein aggregation & precipitation will occur in 1-3 days. Follow methods in below 【IV】 to detect this level.

【III -3】 Preparation example of pCMV-SNCA / F- α Syn / MultiFectam

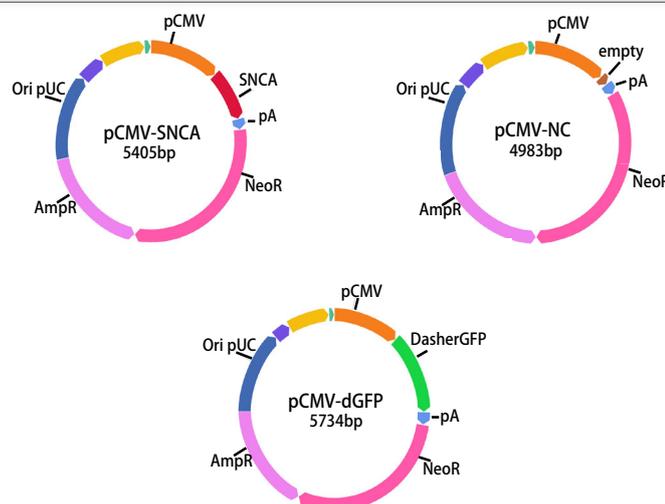
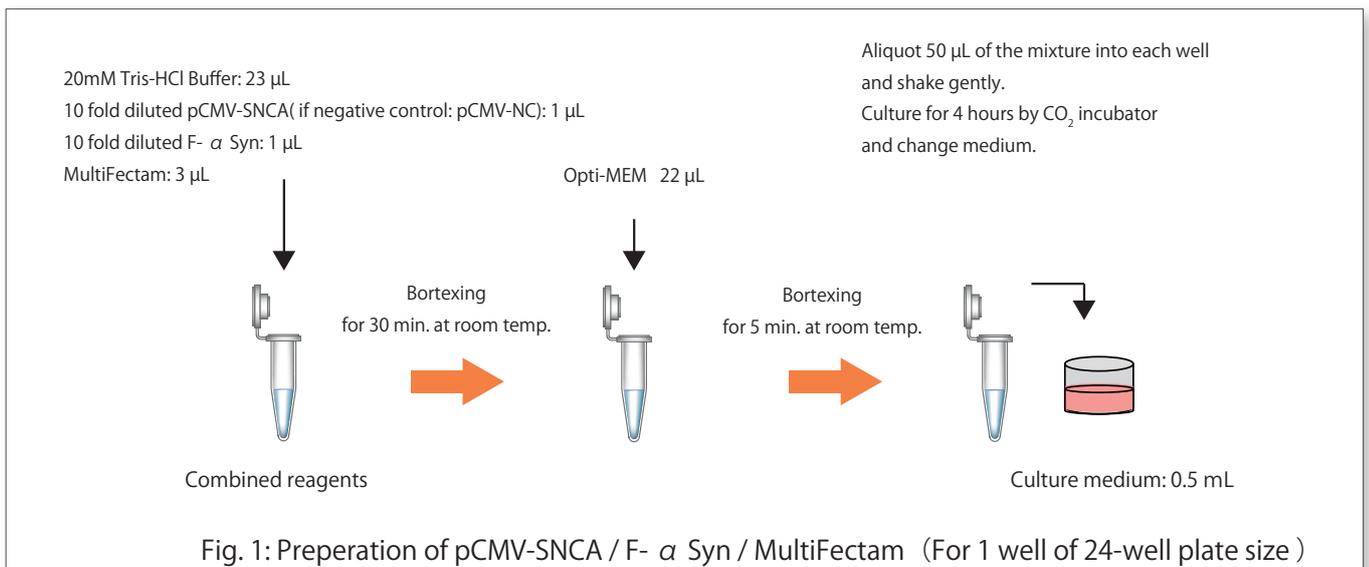
● Below example is for preparation of 1 well of 24 well plate size (culture medium 0.5 mL/well).

1 Combine reagents according to the table below.

	Transfection test	Example
pCMV-SNCA(if negative control: pCMV-NC)	-	0.125 μ g/ well
F- α Syn	-	0.1 μ g/ well
pCMV-dGFP	0.05 ~ 0.5 μ g/well	-
20 mM Tris-HCl Buffer (pH 7.4)	up to 25 μ L	up to 25 μ L
Total 25 μ L	25 μ L	25 μ L

* When confirming transfection efficiency by pCMV-dGFP expression, adjust plasmid amount to become 0.05 ~ 0.5 μ g/well. Replace F- α Syn (1 μ L) with 20 mM Tris-HCl Buffer (pH 7.4). Excitation/fluorescent wavelength of dGFP is 510/521 nm.

- 2 Add 3 μ L MultiFectam, mix the reaction by vortexing to ensure that all reagents are thoroughly mixed. After mixing, spin down and incubate at room temperature for 30 min. (pCMV-SNCA / F- α Syn / MultiFectam complex will form.)
- 3 Add 22 μ L Opti-MEM® or Serum-Free medium, mix the reaction by vortexing to ensure that all reagents are thoroughly mixed. After mixing, spin down and incubate at room temperature for 5 min (still standing).
- 4 Aliquot 50 μ L of pCMV-SNCA / F- α Syn / MultiFectam complex mix into each well, shake gently to distribute evenly. If toxicity is observed, either a.) adjust addition amount to each well, b.) adjust mixture ratio & addition amount of MultiFectam and pCMV-SNCA.

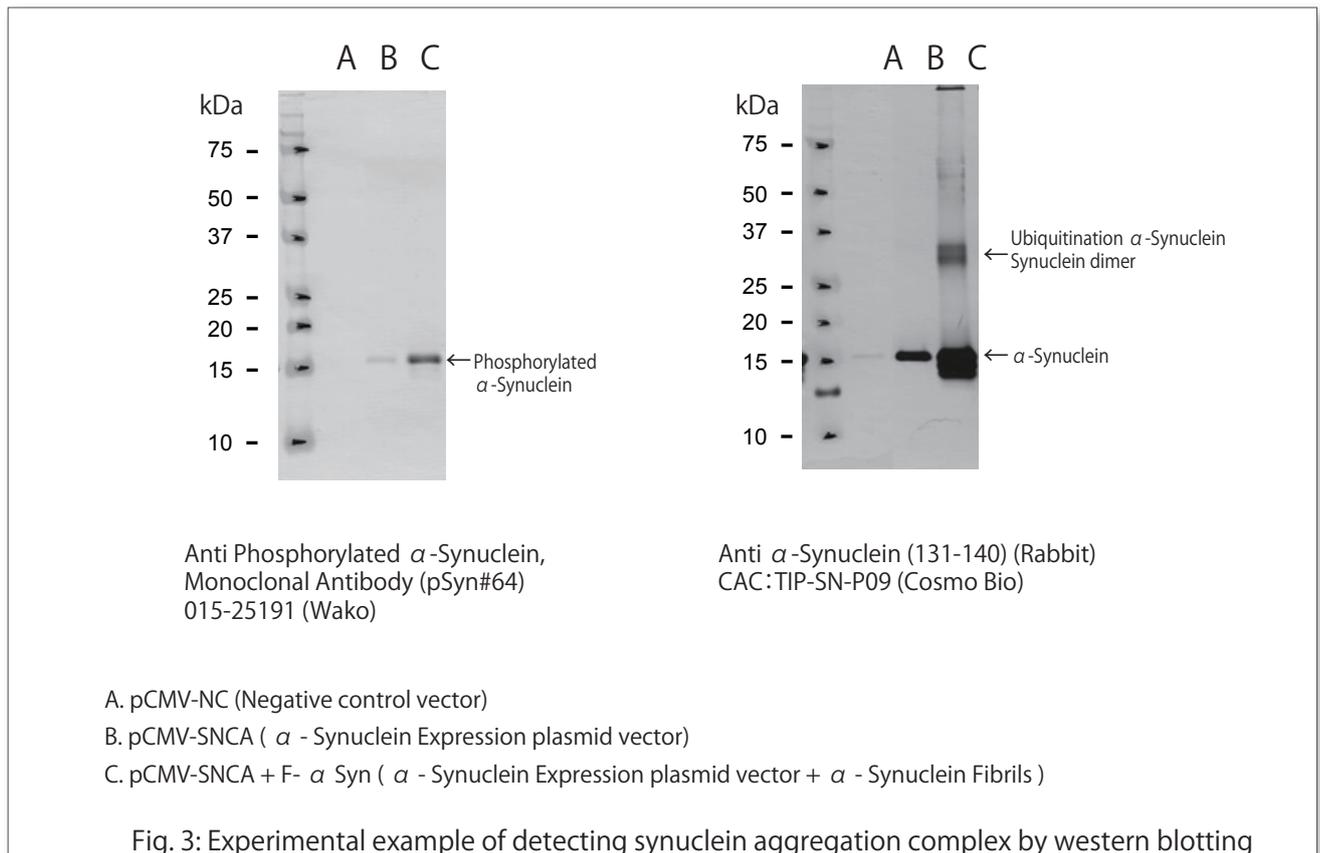


【IV】 Detection example of α -Synuclein aggregation complex

1. Western blotting (Use of various synuclein antibodies)

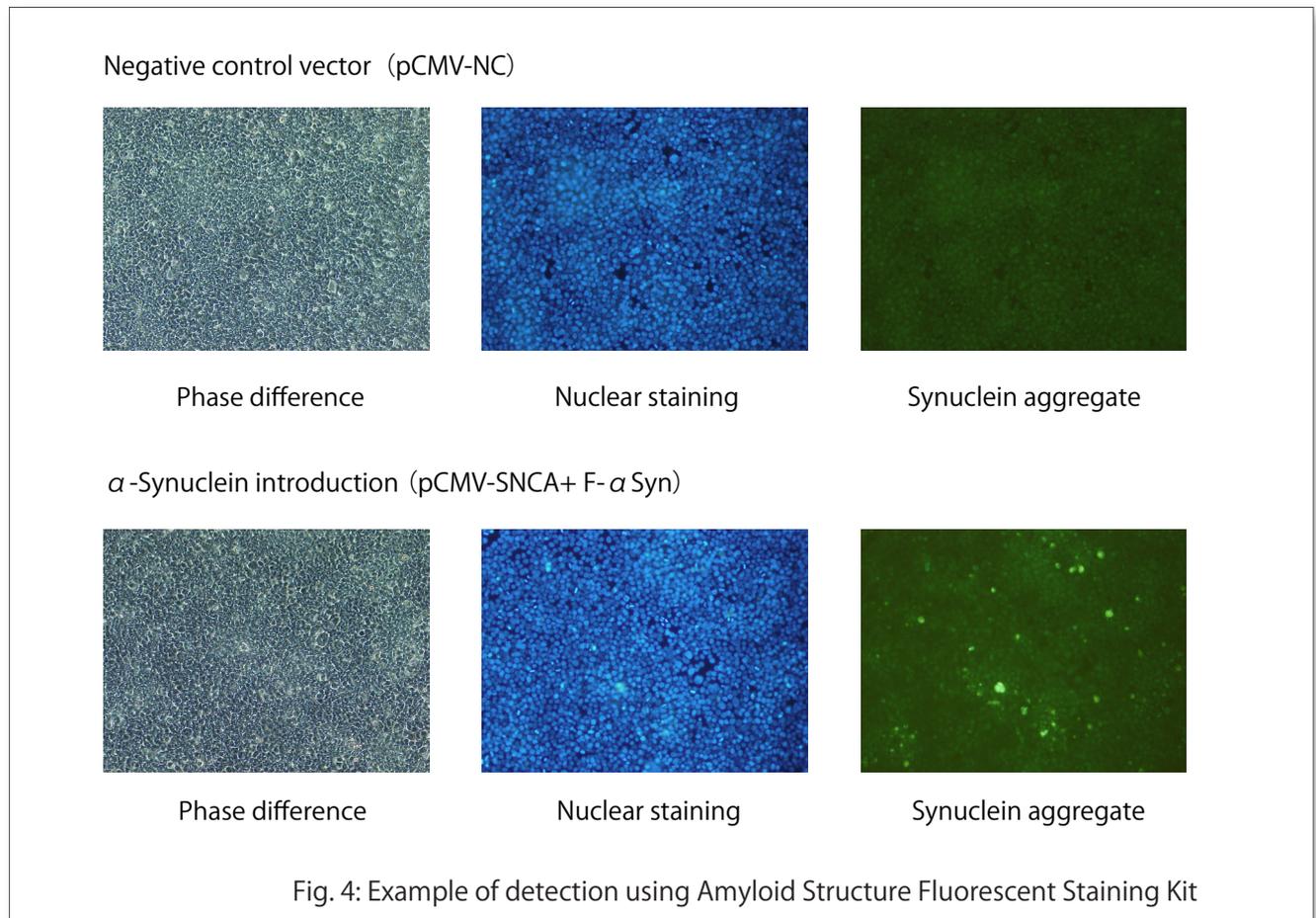
Experimental example:

1. Remove culture medium.
2. Add 1 mL PBS to each well, collect cells by pipetting.
3. Centrifuge (4,500 rpm [1,800 x g], 5 min., room temp.), collect pellet.
4. Add 0.1 mL Lysis Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5 containing 0.8 M NaCl, 1 mM ethyleneglycol bis(2-aminoethyl ether)-N,N,N,N-tetraacetic acid (EGTA), 1 mM DTT and 1% N-Lauroylsarcosine sodium salt), sonicate mixture.
5. Centrifuge (50,000 rpm [100,000 x g], 20 min., room temp.).
6. Add 40 μ L 2 x SDS Buffer (0.125 M Tris-HCl pH6.8, 200 mM 1,4 dithiothreitol (DTT), 4% sodium dodecyl sulfate(SDS), 10% Sucrose, 0.01% BPB) to pellet, sonicate mixture, heat (100 $^{\circ}$ C, 5 min), apply 10 μ L/well for western blotting.



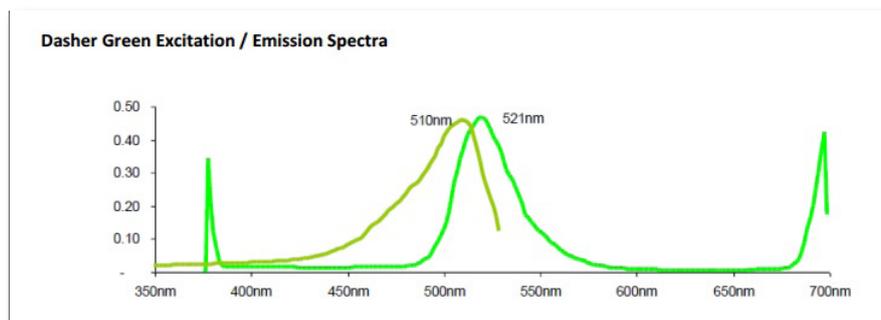
2. Amyloid structure fluorescent staining kit

By use of Amyloid Structure Fluorescent Staining Kit (Cosmo Bio, cat. no. CSR-SYN02), dual staining of aggregated α -Synuclein and nucleolus can be performed.



【V】 Trouble shooting

1. When α -synuclein aggregation doesn't express, use the cells which have high efficiency for gene transfer or which have plenty of satisfactory results. To inspect transfer efficiency, Control Vvector (pCMV-dGFP) is in this kit. Refer to 【III - 2】 for how to use. For Excitation/Emission Spectra, please see the data shown below.
2. When you change the amount of consumption, please try to increase usage of pCMV-SNCA / F- α Syn / MultiFectam complex mix about 2.5 times or more without changing the mixing ratio of this manual mentioned to 【III -3】.
3. If the detection does not work well, we recommend that you do both of the staining and western blotting. When you can't detect by both, please try 【V】 -1.



【VI】 Reference

- [1] J Biol Chem. 2010 Nov 5;285(45):34885-98. doi: 10.1074/jbc.M110.148460. Epub 2010 Aug 30.
Seeded aggregation and toxicity of {alpha}-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases.
Nonaka T, Watanabe ST, Iwatsubo T, Hasegawa M.
PMID : 20805224

【VII】 Related products

Description	Cat. No.	Quantity
Amyloid Fluorescent Staining Kit	CSR-SYN02	100 TEST
α -Synuclein Fibrils	CSR-SYN03	0.1 MG
Human α -Synuclein, Recombinant, E.coli	CSR-SYN04	0.1 MG
		1 MG
Mouse α -Synuclein Fibrils	CSR-SYN05	1 MG
Mouse α -Synuclein, Recombinant, E.coli	CSR-SYN06	0.1 MG
		1 MG

 COSMO BIO Co., LTD.

【JAPAN】
TOYO EKIMAE BLDG. 2-20, TOYO 2-CHOME,
KOTO-KU. TOKYO 135-0016, JAPAN
Phone: +81-3-5632-9610
FAX: +81-3-5632-9619
URL: <https://www.cosmobio.co.jp/>

 COSMO BIO USA

【Outside Japan】
2792 Loker Ave West, Suite 101
Carlsbad, CA 92010, USA
email: info@cosmobiousa.com
URL: www.cosmobiousa.com
Phone/FAX: (+1) 760-431-4600



一般研究用キット

α - Synuclein Aggregation Assay Kit

α - シヌクレイン 凝集アッセイキット

Cat. No. SYN01

※本製品は 東京都医学総合研究所 認知症・高次脳機能研究分野 長谷川 成人 先生、野中 隆 先生からのライセンス品です。

2020年4月15日作成

www.cosmobio.co.jp

【I】背景

認知症とは記憶や判断力に障害が起こる病気で、高齢者人口が急速に増加している我が国では認知症予備軍を含めおよそ800万人の方々が苦しめられています。しかしながら、いまだに根本的な治療法は見つかっていません。長年の研究により、認知症を含む多くの神経変性疾患では、脳などの変性部位にある種のタンパク質から成る固まり（凝集体）が認められ、凝集体の出現が病気の発症や進行と密接に関係していることが分かってきました。

凝集体とは、正常なタンパク質が何かのきっかけで異常な構造になり細胞内で蓄積したものです。また病気毎に蓄積するタンパク質も異なります。パーキンソン病、レビー小体型認知症および多系統萎縮症の患者脳では、 α -シヌクレインというタンパク質が細胞内で構造変化を起こし、凝集体を形成することが知られています。

本キットは α -シヌクレインの凝集体形成を細胞内で再現するモデルであり、*in vitro*における有効成分のスクリーニングが可能です。

【II -1】キット構成

- 本製品は【III-2】の調製方法で実施した場合、24ウェルプレートで300ウェル分の試薬量となります。
- 本製品のプラスミドベクターはATUM社で合成した商品を使用しています。

内容	容量	数量	保存温度	取扱上の注意
pCMV-SNCA* (α -シヌクレイン 発現プラスミドベクター、 赤キャップ)	32 μ L (濃度:1.25 μ g/ μ L)	1本	解凍後 4°C	取扱う際には眼鏡・手袋などの保護具を着用の上、人体の接触を避けるよう十分に配慮してください。 (*ベクター3種は購入者のみライセンス、第三者への譲渡は禁止)
pCMV-NC* (ネガティブコントロール ベクター、緑キャップ)	5 μ L (濃度:1.25 μ g/ μ L)	1本		
pCMV-dGFP* (dGFP発現プラスミドベ クター、青キャップ)	5 μ L (濃度:1.25 μ g/ μ L)	1本		
20 mM Tris-HCl Buffer (pH7.4)	10 mL	1本		取扱う際には眼鏡・手袋などの保護具を着用の上、人体の接触を避けるよう十分に配慮してください。
F- α Syn (α -シヌクレイン線維化 タンパク質、黄キャップ)	32 μ L (濃度:1 μ g/ μ L)	1本	-80°C	α -シヌクレイン線維化タンパク質は、解凍後1ヶ月までは15-30°C遮光条件で保管が可能です。長期保管をする場合は一度に使い切る分量に小分けして-80°Cで保管してください。廃棄する際は、オートクレーブ処理(134°C・20分)、もしくはSDS(3%以上)を加えてオートクレーブ処理(121°C, 20分)を行ってください。条件を満たせない場合は、「感染性廃棄物」の取り扱いに従って廃棄してください。
MultiFectam (遺伝子導入試薬)	0.33 mg	1本	解凍後 4°C	ボトルのラベルには保存温度:-20°Cと記載していますが、溶解前の粉末状態では4°Cでも安定です。なお、溶解後は4°C、または凍結にて保存してください。

本品は、研究目的にのみご使用ください。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないでください。
本マニュアルをご精読のうえ、研究目的にのみご使用ください。

【II -2】ご準備いただくもの（その他必要なもの）

- アッセイ用細胞株（推奨：SH-SY5Y）
- 培養用培地（推奨：DE/F-12、10% FBS、1% NEAA）
- Opti-MEM® または無血清培地（サーモフィッシャーサイエンティフィック：31985062 等をご用意ください）
- 滅菌済み精製水（DNase, RNase フリー）

※ III -1 から III -3 までの操作はクリーンベンチ内で無菌的に行ってください。

【III - 1】試薬の事前調製

- pCMV-SNCA (α -シヌクレイン発現プラスミドベクター) および pCMV-NC (ネガティブコントロールベクター)、pCMV-dGFP (dGFP 発現プラスミドベクター)

実験系の使用量に合わせて滅菌済み精製水で希釈してください（用時調製）。

例）24 ウェルプレート使用時、10 倍希釈液で 1 μ L/ ウェルの使用量です。

- F- α Syn (α -シヌクレイン線維化タンパク質)

実験系の使用量に合わせて滅菌済み精製水で希釈してください（用時調製）。

例）24 ウェルプレート使用時、10 倍希釈液で 1 μ L/ ウェルの使用量です。

※注意事項：F- α Syn を廃棄する際は、オートクレーブ処理 (134°C・20 分)、もしくは SDS (3% 以上) を加えてオートクレーブ処理 (121°C, 20 分) を行ってください。

温度条件を満たせない場合は、「感染性廃棄物」の取り扱いに従って廃棄してください。

- MultiFectam (遺伝子導入試薬)

MultiFectam に 1 mL の滅菌済み精製水（室温）を加え、約 10 秒間静置します。その後、ボルテックスでよく混合してご使用ください。

溶解後は冷蔵で 3 か月間、凍結で 6 か月間 使用可能です。凍結融解は 6 回まで性能維持が確認されていますが、6 回以上凍結融解を繰り返さないよう小分け分注してご使用ください。

【III -2】キットの使用方法

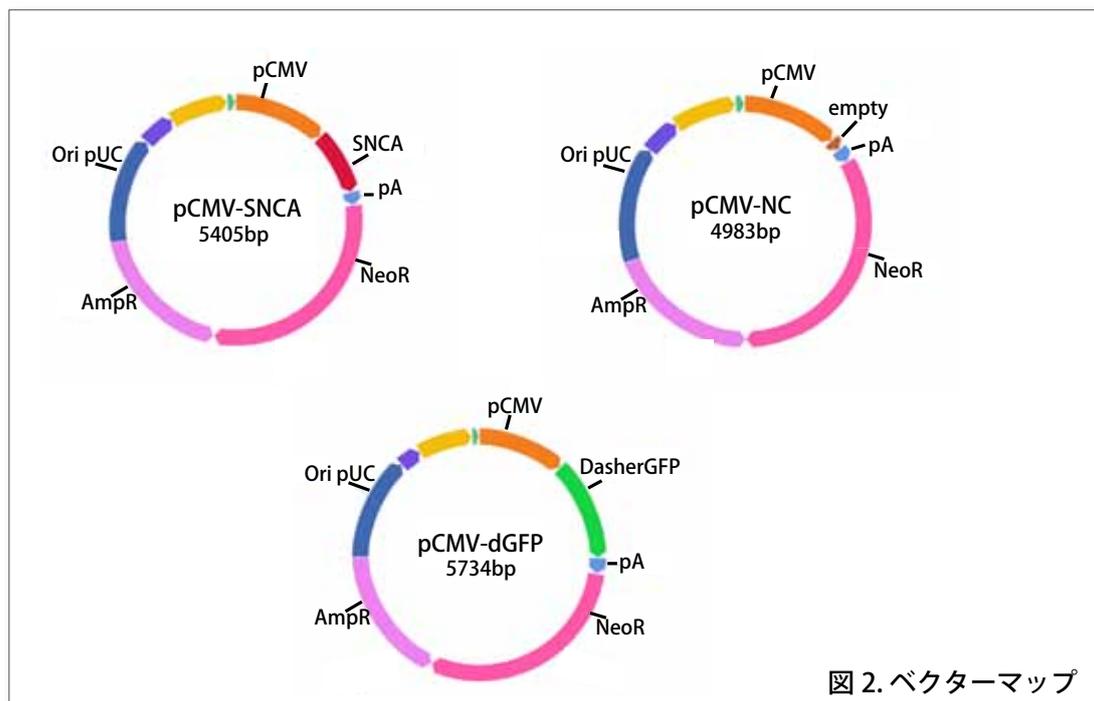
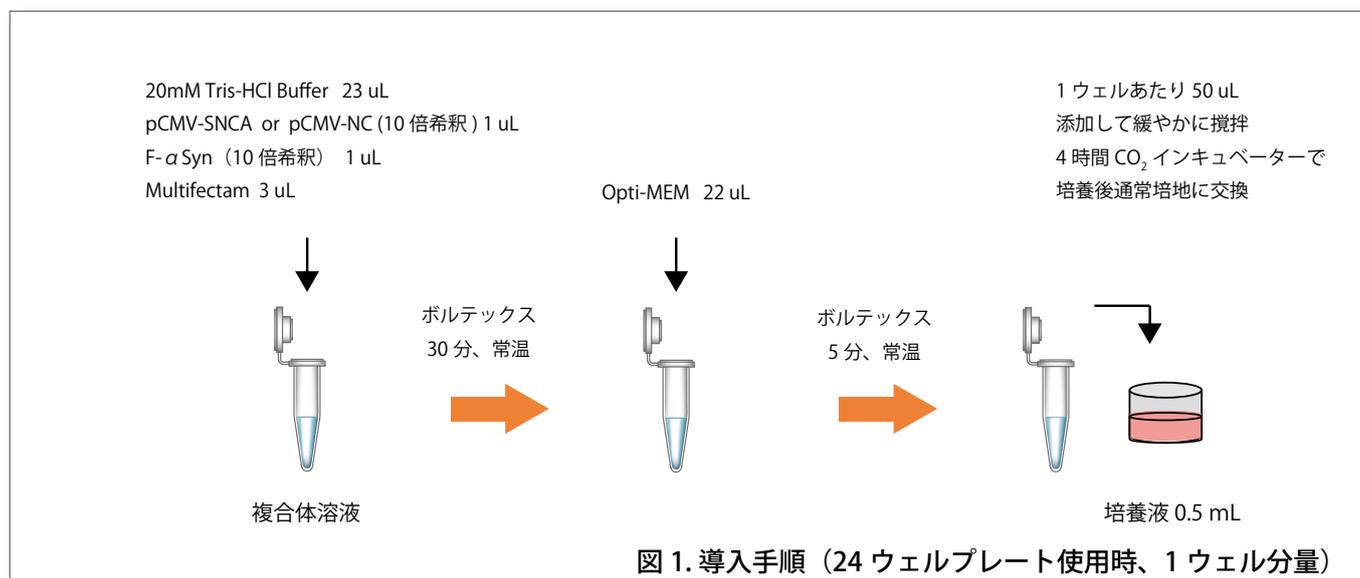
- 以下は SH-SY5Y 細胞を用いた培養実験例です。
- 他の細胞を使用する場合や初回の実験では下記プロトコルの使用量を参考に、pCMV-dGFP ベクターを用いて導入条件の予備検討を実施されることをお勧めします。
- 被験物質の添加時期：被験物質は評価したい目的に合わせて下記の 4 以降のいずれかのタイミングから選択してください。

- 1 予備培養にて必要な細胞数を準備します。
- 2 マルチウェルプレートに 3×10^4 cells/cm² の密度で播種します。
- 3 50 ~ 60%（細胞と培地のコンディションによりますが 1 ~ 3 日後）コンフルエントになったら、【III-3】「pCMV-SNCA / F- α Syn / MultiFectam の調製方法」にしたがって α -シヌクレイン発現プラスミドベクターおよび α -シヌクレイン線維化タンパク質を調製し、培地に添加します。
- 4 4 時間後、培養用培地に交換します。
- 5 その後、1 ~ 3 日で α -シヌクレインの凝集沈着が起こります。【IV】に記載の方法で検出可能です。

【III -3】 pCMV-SNCA / F- α Syn / MultiFectam の調製方法例

● 以下は 24 ウェルプレートを使用する場合の 1 ウェルあたりの調製量です。培養液は 1 ウェル当たり、0.5 mL とします。

- 1 20 mM Tris-HCl Buffer (pH 7.4) 23 μL に、10 倍希釈した pCMV-SNCA(ネガティブコントロールの場合 pCMV-NC) 1 μL(0.125 μg/ ウェル)、10 倍希釈した F- α Syn 1 μL (0.1 μg/ ウェル) を加え、1 ウェルあたり 25 μL となるよう調製します。
 ※ pCMV-dGFP で導入効率を確認する場合、0.05 ~ 0.5 μg/ ウェル程度を目安にプラスミド量の条件を設定し、F- α Syn は加えずに 1 ウェルあたり 25 μL となるよう 20 mM Tris-HCl Buffer (pH 7.4) の量を調整します。dGFP の励起 / 蛍光波長は 510/521 nm です。
- 2 調製した 25 μL の pCMV-SNCA / F- α Syn 溶液に、3 μL / ウェルの MultiFectam を加え、ボルテックスでよく混合し、室温で 30 分間インキュベートします (複合体溶液の作製)。
- 3 さらに 22 μL / ウェルの Opti-MEM®、または無血清培地を添加し、よく混合して、室温で 5 分間静置します。
- 4 1 ウェルあたり 50 μL の pCMV-SNCA / F- α Syn / MultiFectam 複合体溶液を加え、均一になるようプレートを揺らして混合します。毒性が確認される場合は、1 ウェル当たりの添加量を減らす、もしくは MultiFectam と pCMV-SNCA の混合比率・添加量の検討を行ってください。



α -Synuclein Aggregation Assay Kit

 - α -シヌクレイン凝集アッセイキット -

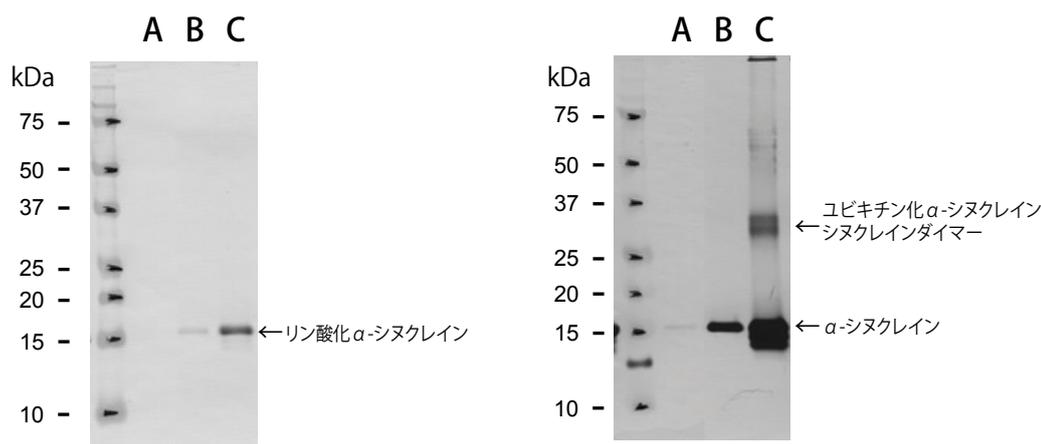
Cat. No. SYN01

【IV】シヌクレイン凝集体の検出実験例
1. ウェスタンブロット法による評価

各種シヌクレイン抗体を用いて、ウェスタンブロットによる検出が可能です。

実験条件 (例)

- I. 培養液除去
- II. 1 mL PBS をウェルに加えて、ピペティングにて細胞を回収
- III. 4,500 rpm, 5 分間遠心, 細胞ペレットを回収
- IV. 0.1 mL Lysis Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5 containing 0.8 M NaCl, 1 mM ethyleneglycol bis(2-aminoethyl ether)-N,N,N,N-tetraacetic acid (EGTA), 1 mM DTT and 1% N-Lauroylsarcosine sodium salt) を加えて, ソニケーション
- V. 50,000 rpm (100,000 x g) x 20 分間遠心, 室温
- VI. 沈殿に 40 μ L 2 x SDS Buffer (0.125 M Tris-HCl pH6.8, 200 mM 1,4 dithiothreitol (DTT), 4% sodium dodecyl sulfate(SDS), 10% Sucrose, 0.01% BPB) を加えてソニケーション, 100 度, 5 分間加熱, 10 μ L アプライ


 抗リン酸化 α -シヌクレイン
 モノクローナル抗体 (pSyn#64)
 和光純薬: 015-25191 を使用

 Anti α Synuclein (131-140) (Rabbit)
 コスモ・バイオ CAC: TIP-SN-P09 を使用

A. pCMV-NC (ネガティブコントロールベクター)

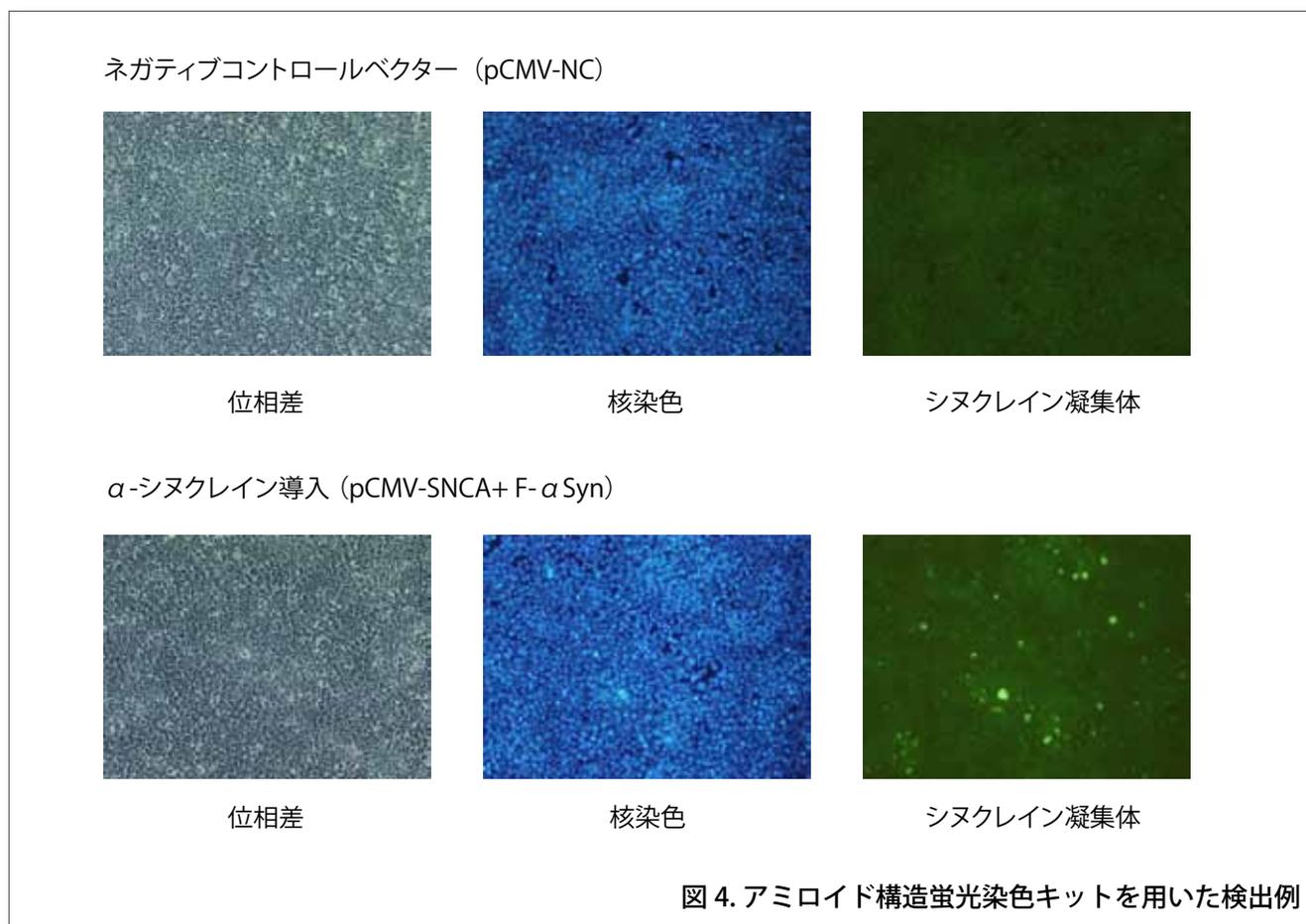
 B. pCMV-SNCA (α -シヌクレイン発現プラスミドベクターのみ導入)

 C. pCMV-SNCA + F- α Syn (α -シヌクレイン発現プラスミドベクター + α -シヌクレイン線維化タンパク質導入)

図 3. ウェスタンブロット法によるシヌクレイン凝集体の検出実験例

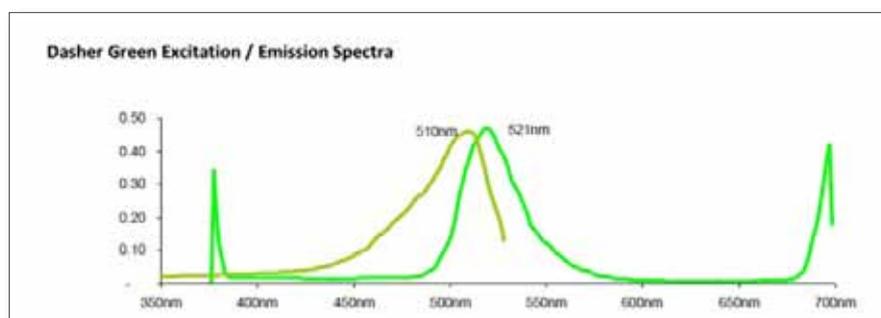
2. アミロイド構造蛍光染色キットを用いた検出

アミロイド構造蛍光染色キット（コスモ・バイオ：品番 SYN02）を用いて、凝集沈着した α -シヌクレインおよび核の 2 重染色が可能です。



【V】アッセイのトラブルシューティング

1. α -シヌクレインの凝集沈着ができないときは、遺伝子導入の効率が良い株や、導入した実績・経験が豊富な株で実験することをお勧めします。導入効率を検証するために、ベクター配列が同じで GFP 遺伝子を挿入しているコントロールベクター（pCMV-dGFP）がキットに付属しております。方法は【III - 2】を参照してください。励起 / 蛍光波長については下のスペクトルデータを参考に観察を行ってください。
2. 実験系の条件設定を組む際、細胞毒性が心配な場合は本マニュアルの「pCMV-SNCA / F- α Syn / MultiFectam」の混合比率を変えずに、使用量を 2.5 倍程度増やすことからお試しください。
3. 検出がうまくいかない場合は、染色法とウェスタンブロット法の両方を行うことをお勧めします。両方で検出できないときは、凝集沈着がしていない可能性が高いので「1」をお試しください。



 **α -Synuclein Aggregation Assay Kit**— α -シヌクレイン凝集アッセイキット —

Cat. No. SYN01

www.cosmobio.co.jp

【VI】 参考文献

- [1] J Biol Chem. 2010 Nov 5;285(45):34885-98. doi: 10.1074/jbc.M110.148460. Epub 2010 Aug 30.
Seeded aggregation and toxicity of {alpha}-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases.
Nonaka T, Watanabe ST, Iwatsubo T, Hasegawa M. PMID : 20805224

【VII】 関連商品

メーカー略号：CSR			
品番	品名	内容量	希望販売価格(税抜)
SYN02	アミロイド構造蛍光染色キット	100 TEST	60,000 円
SYN03	α -シヌクレイン線維化タンパク質(ヒト型)	0.1 MG	100,000 円
SYN04	α -シヌクレインリコンビナントタンパク質(ヒト型)	0.1 MG	30,000 円
		1 MG	90,000 円
SYN05	α -シヌクレイン線維化タンパク質(マウス型)	0.1 MG	100,000 円
SYN06	α -シヌクレインリコンビナントタンパク質(マウス型)	0.1 MG	30,000 円
		1 MG	90,000 円

本商品をご利用になられた文献、発表データを募っております。

本商品をご利用いただき投稿された論文、学会発表/パネルなどを送付いただきましたお客様に粗品を進呈させていただきます。ご提供いただきました論文などは、WEB やカタログ、技術資料を通じて多くの研究者の方への技術情報として利用させていただく場合がございます。是非皆様のご協力をお願いいたします。

送付方法**郵 送**

〒047-0261 北海道小樽市銭函3丁目513番2
コスモ・バイオ株式会社 札幌事業所宛

E-mail

primarycell@cosmobio.co.jp ※ PDF ファイルにてお送りください。

12390



コスモ・バイオ株式会社
COSMO BIO Co., LTD.

〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
URL : http://www.cosmobio.co.jp/

● 営業部 (お問い合わせ)
TEL : (03) 5632-9610 FAX : (03) 5632-9619
TEL : (03) 5632-9620

● 札幌事業部 (技術的なお問い合わせ)
TEL : (0134) 61-2301 FAX : (0134) 61-2295
E-mail : primarycell@cosmobio.co.jp