

产品目录号:

**V1502**  
**V1503**

## cAMP-Glo™ 检测简明操作步骤



注意: 这是节选操作步骤, 详细英文说明书见 <http://www.promega.com/tbs/tb357/tb357.pdf> 本简明操作步骤电子版见 [www.promega.com.cn](http://www.promega.com.cn)

### I. 产品组分和储存条件

产品	包装	目录号
cAMP-Glo™ 检测	300 次(384 孔板)	V1501

每个试剂盒包含的试剂, 足够进行 300 次 384 孔板操作。

包含的试剂有:

- 100µl cAMP, 1mM
- 5ml cAMP-Glo™ Lysis Buffer
- 8ml cAMP-Glo™ Reaction Buffer
- 16µl Protein Kinase A
- 1 瓶 Kinase-Glo® Substrate (冻干粉)
- 10ml Kinase-Glo® Buffer

产品	包装	目录号
cAMP-Glo™ 检测	3,000 次 (384 孔板)	V1502

试剂盒包含两个组分: cAMP-Glo™ 检测 (目录号 V1504) 和 Kinase-Glo® 荧光激酶检测 (目录号 V6713)。

包含的试剂足够进行 3,000 次 384 孔板操作。包含的试剂有:

- 100µl cAMP, 1mM
- 25ml cAMP-Glo™ Lysis Buffer
- 50ml cAMP-Glo™ Reaction Buffer
- 160µl Protein Kinase A
- 1 瓶 Kinase-Glo® Substrate (冻干粉)
- 100ml Kinase-Glo® Buffer

产品	包装	目录号
cAMP-Glo™ 检测	30,000 次 (384 孔板)	V1503

试剂盒包含三个组分: cAMP-Glo™ 检测 (目录号 V1505), 蛋白激酶 A (目录号 V1506) 和 Kinase-Glo® 荧光激酶检测 (目录号 V6714)。包含的试剂足够进行 30,000 次 384 孔板检测。包含的试剂有:

- 500µl cAMP, 1mM
- 250ml cAMP-Glo™ Lysis Buffer
- 500ml cAMP-Glo™ Reaction Buffer
- 10X160µl Protein Kinase A
- 10 瓶 Kinase-Glo® Substrate (冻干粉)
- 10X100ml Kinase-Glo® Buffer

#### 储存条件:

- -20°C。
- 在使用前, 除蛋白激酶 A 外, 所有的组分都应在室温彻底融解。
- 蛋白激酶 A 如果不在 -20°C 就应放在冰上。
- 融解后, 所有的组分应在使用前彻底混匀。
- 一旦配制好, cAMP 检测溶液 (加入了蛋白酶 A 的 cAMP 反应缓冲液) 不能再冷冻。
- 一旦配制, Kinase-Glo® 试剂应该分装保存于 -20°C。
- 试剂有效期见标签。

# cAMP-Glo™ 检测简明操作步骤



## II. 细胞处理

cAMP-Glo™检测可用于贴壁细胞，悬浮细胞和冻存细胞。贴壁细胞要在检测前孵育过夜使细胞贴附在基质上。悬浮和冻存细胞不需要过夜孵育，可以在检测当天准备。这个手册推荐的细胞数和培养条件是按 HEK293 细胞开发的。其它贴壁细胞或悬浮细胞或冻存细胞的数目和培养条件可能需要另行优化。选择一个已知激活剂或拮抗剂来确定对 cAMP 产生最大影响的最佳条件。

关于如何进行细胞准备的更多内容，请阅读《cAMP-Glo™ 检测技术手册 TB357》：  
<http://www.promega.com/tbs/tb357/tb357.pdf>

## III. 准备 cAMP-Glo™ 检测

### 制备试剂:

- 1, 制备 4.0uM cAMP 溶液: 将 250ul 诱导缓冲液和 1.0ul 1mM cAMP 混合, 振荡混匀。
- 2, 将全部 Kinase-Glo® 缓冲液倒入装有 Kinase-Glo® 底物的棕色瓶中, 轻轻混匀。

### 制作 cAMP 标准曲线

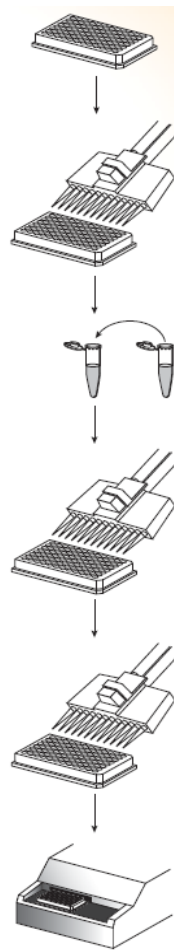
- 3, 在一块 96 孔板的 A2 到 A12 孔中加入 100ul 诱导缓冲液。
- 4, 在 A1 孔中加入 200ul 4.0uM cAMP 溶液。
- 5, 从 A1 孔开始, 到 A11 孔, 进行 4.0uM cAMP 溶液的 2 倍系列稀释。不要在 A12 孔加 cAMP 溶液。A12 孔是无 cAMP 对照孔。
- 6, 如果用 96 孔板进行检测。转移每个浓度的 cAMP 标准液 20ul 到 96 孔板上为 cAMP 标准曲线预留的各孔中。如果用 384 孔检测, 则转移 7.5ul。如果用小体积 384 孔板或 1536 孔板, 转移 1ul。

## IV. cAMP-Glo™ 检测步骤

- 1, 用溶有拮抗物或测试化合物的诱导缓冲液处理细胞一段时间。
- 2, 加 20ul (96 孔板), 7.5ul (384 孔板) 或 1.0ul (小

体积 384 孔板和 1536 孔板)的 cAMP-Glo™ 裂解液到所有孔中。室温振摇孵育 15 分钟。

- 3, 制备 cAMP 检测液: 取 2.5ul (96 孔板), 3.5ul (384 孔板) 或 5.0ul (小体积 384 孔板和 1536 孔板) PKA 加入 1.0ml 的 cAMP-Glo™ 反应液中, 颠倒混匀。
- 4, 加入 40ul (96 孔板), 15ul (384 孔板) 或 2.0ul (小体积 384 孔板和 1536 孔板)的 cAMP-Glo™ 检测液到所有的孔中, 摇动平板 30—60 秒混匀溶液。室温孵育 20 分钟。
- 5, 加入 80ul (96 孔板), 30ul (384 孔板) 或 4.0ul 小体积 384 孔板和 1536 孔板) 室温 Kinase-Glo® 试剂到所有的反应中。摇动平板 30—60 秒混匀溶液。室温孵育 10 分钟。
- 6, 用平板荧光发光计测量荧光值。



准备检测平板, 包含 cAMP 标准液, 以及处理过和未处理过的细胞

向检测板的所有孔内加入 cAMP-Glo™ 裂解液

配制 cAMP 检测液

向检测板的所有孔内加入 cAMP 检测液, 混匀, 室温孵育。

向检测板的所有孔内加入 Kinase-Glo® 试剂, 混匀, 室温孵育。

测量荧光。



## cAMP-Glo™ 检测简明操作步骤

### V. 确定 EC<sub>50</sub> 值

#### 准备测试化合物

- 1, 若是悬浮细胞, 制备测试化合物在诱导缓冲液中的 2X 母液。若是贴壁细胞, 制备 1X 母液。混合均匀。
- 2, 在一块 96 孔板的 A1 到 A11 孔中进行测试化合物的 2 倍系列稀释。不要在 A12 孔中加入测试化合物。A12 孔是无测试化合物对照。

#### 检测步骤

- 1, 如果用 96 孔板检测悬浮细胞, 转移 10ul 不同浓度测试化合物到检测平板上, 若是 384 孔板, 转移 3.75ul, 若是小体积 384 孔板或 1536 孔板, 转移 0.5ul。加入等体积细胞悬液。

如果用 96 孔板检测贴壁细胞, 转移 20ul 不同浓度的测试化合物到含有细胞的检测平板上, 若是 384 孔板, 转移 7.5ul, 若是小体积 384 孔板和 1536 孔板, 转移 1.0ul。

- 2, 摇板 30–60 秒混匀。室温孵育 15 分钟。
- 3, 加入 20ul (96 孔板), 7.5ul (384 孔板) 或 1.0ul (小体积 384 孔板和 1536 孔板) 的 cAMP-Glo™ 裂解液到所有孔中。摇板室温孵育 15 分钟。
- 4, 制备 cAMP 检测溶液如下: 每 1.0ml 的 cAMP-Glo™ 反应缓冲液中, 加入 2.5ul (96 孔板), 3.5ul (384 孔板) 或 5.0ul (小体积 384 孔板和 1536 孔板) 蛋白激酶 A, 颠倒混匀。
- 5, 加入 40ul (96 孔板), 15ul (384 孔板) 或 2.0ul (小体积 384 孔板和 1536 孔板) 的 cAMP 检测液到所有的孔中, 摇动平板 30–60 秒混匀。室温孵育 20 分钟。
- 6, 加入 80ul (96 孔板), 30ul (384 孔板) 或 4.0ul (小体积 384 孔板和 1536 孔板) 室温 Kinase-Glo® 试剂到所有孔中。摇板 30–60 秒混匀溶液。室温孵育 10 分钟。
- 7, 用平板荧光发光仪检测荧光。

### VI. 确认 IC<sub>50</sub> 值

#### 准备测试化合物

- 1, 若是贴壁细胞, 用诱导缓冲液配制浓度适当的受体特异性拮抗剂 (agonist) (例 100nM SKF38393) 测试化合物的 1X 母液。如果是悬浮细胞, 制备 2X 母液。混和均匀。
- 2, 在一块 96 孔板上的 A1 到 A11 孔进行测试化合物的 2 倍系列稀释。不要在 A12 孔加测试化合物, A12 孔是无拮抗物对照。

#### 检测步骤

- 1, 如果使用 96 孔板检测悬浮细胞, 转移 10ul 不同浓度的测试化合物到测试板的孔里。如果是 384 孔板, 转移 3.75ul, 如果是小体积 384 孔板和 1536 孔板, 转移 0.5ul。再加入同体积的悬浮细胞。

如果使用 96 孔板检测贴壁细胞, 转移 20ul 不同浓度的测试化合物到含有细胞的检测板上。如果是 384 孔板, 转移 7.5ul。如果是小体积 384 孔板和 1536 孔板, 转移 1ul。

- 2, 摇板 30–60 秒混和均匀。室温孵育 20 分钟。
- 3, 加入 20ul (96 孔板), 7.5ul (384 孔板) 或 1.0ul (小体积 384 孔板和 1536 孔板) 的 cAMP-Glo™ 裂解液到所有孔。室温, 摇板孵育 15 分钟。
- 4, 制备 cAMP 检测溶液如下: 每 1.0ml 的 cAMP-Glo™ 反应缓冲液, 加入 2.5ul (96 孔板), 3.5ul (384 孔板) 或 5.0ul (小体积 384 孔板和 1536 孔板) 的蛋白激酶 A。颠倒混匀。
- 5, 加入 40ul (96 孔板), 15ul (384 孔板) 或 2.0ul (小体积 384 孔板和 1536 孔板) 的 cAMP 检测液到所有孔中。摇板 30–60 秒混匀。室温, 孵育平板 2 分钟。
- 6, 加入 80ul (96 孔板), 15ul (384 孔板) 或 4.0ul (小体积 384 孔板和 1536 孔板) 室温的 Kinase-Glo® 试剂到所有孔中。摇板 30–60 秒混和。室温孵育 10 分钟。

## VII. 确定 Z' 因子

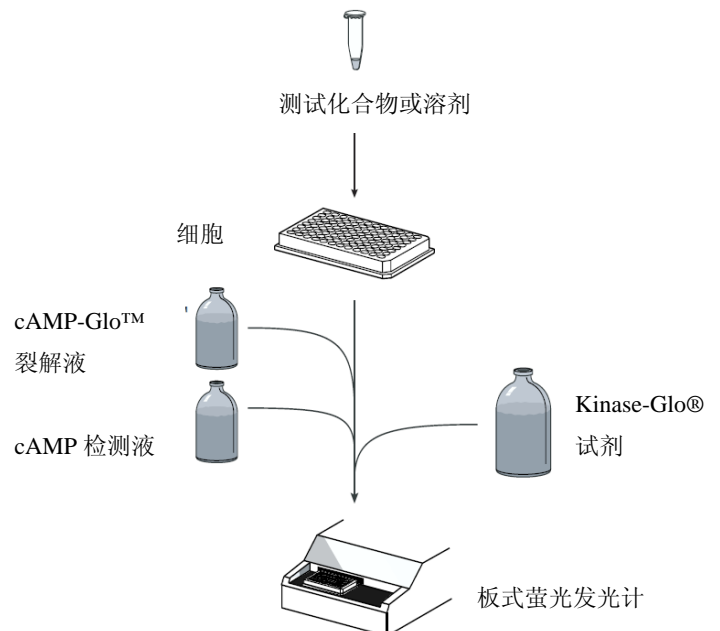
### 准备试剂

1, 按下表混合 1mM cAMP 和诱导缓冲液, 制备 100nM cAMP 溶液。振荡混匀。

组分	96 孔板	384 孔板	小体积 384 孔板 和 1536 孔板
诱导缓冲液	1,000ul	1,600ul	500ul
1mM cAMP	0.4ul	0.64ul	0.2ul

### 检测步骤

- 按如下操作准备无 cAMP 反应: 向一半检测板的每个孔中加入 20ul (96 孔板), 7.5ul (384 孔板) 或 1.0ul (小体积 384 孔板和 1536 孔板) 诱导缓冲液。
- 按如下操作准备 cAMP 反应: 向另一半检测板的每个孔中加入 20ul (96 孔板), 7.5ul (384 孔板) 或 1.0ul (小体积 384 孔板和 1536 孔板) 的 100nM cAMP。
- 加入 20ul (96 孔板), 7.5ul (384 孔板) 或 1.0ul (小体积 384 孔板和 1536 孔板) 的 cAMP-Glo™ 裂解液到所有孔中。室温, 摇板孵育 15 分钟。
- 按如下操作准备 cAMP 检测溶液: 每 1.0ml cAMP-Glo™ 反应缓冲液加入 2.5ul (96 孔板), 3.5ul (384 孔板) 或 5.0ul (小体积 384 孔板和 1536 孔板) 的蛋白激酶 A。颠倒混匀。
- 加入 40ul (96 孔板), 15ul (384 孔板) 或 2.0ul (小体积 384 孔板和 1536 孔板) 的 cAMP 检测液到所有孔中。摇板混和 30-60 秒。室温孵育 20 分钟。
- 加入 80ul (96 孔板), 30ul (384 孔板) 或 4.0ul (小体积 384 孔板和 1536 孔板) 室温 Kinase-Glo® 试剂到所有孔。摇板 30-60 秒混和。室温孵育 10 分钟。
- 用平板荧光发光仪检测荧光。



右图: cAMP-Glo™试剂准备和检测步骤流程概图