

PepTag[®] 非放射性蛋白激酶 C 或依赖于 cAMP 的蛋白激酶检测系统

这份说明书的英文原文可以从以下网址下载 <http://www.promega.com>. 请登陆以上网页查看您是否使用的是最新版的说明书。如果您在使用这个系统时有任何问题, 请与 Promega 技术支持联系。邮件: chinatech@promega.com.cn

1. 描述.....	1
2. 产品组分和储存条件.....	4
3. PepTag [®] 定性检测的操作步骤.....	4
A. 为 PKC 检测准备组织或细胞样品.....	5
B. PKC 检测操作步骤.....	5
C. 为 PKA 检测准备组织或细胞样品.....	8
D. PKA 检测操作步骤.....	8
E. 凝胶的制备.....	11
F. 用电泳分离磷酸化和非磷酸化的 PepTag [®] 短肽.....	12
4. 对 PepTag [®] 检测结果进行定量分析.....	13
A. 通过分光光度法定量.....	13
B. 活性的计算.....	14
C. 通过光密度扫描法定量.....	16
D. 通过荧光分光光度法定量.....	16
5. 参考文献.....	18
6. 附录.....	18
A. 缓冲液和溶液的配方.....	17
B. 相关产品.....	19
7. 实验小提醒.....	20

1. 描述

对蛋白激酶以及它们在细胞调控中的作用的研究是一些不断发展的领域。随着对这些领域兴趣的提高, 人们对快速检测激酶活性的手段的需求也在不断增长。检测激酶活性的最常见的方法是测量被放射性标记上的磷酸根基团转移到蛋白或短肽底物上的数量。尽管这种检测方法很有效, 但是大量 ³²P 的使用使该检测方法不太方便并且可能有危险。我们研发的 PepTag[®] 非放射性蛋白激酶检测系统为检测蛋白激酶 C (PKC) 和依赖于 cAMP-的蛋白激酶 (PKA) 提供了快速、灵敏、非放射性的方法。

PepTag[®]检测系统使用了发荧光的明亮的短肽做底物,该底物对所研究的激酶具有高度特异性。明亮的粉色来自于加到 PepTag[®]短肽底物上的染料分子。PKC 或 PKA 对其各自的特异底物的磷酸化使短肽的净电荷从+1 变成-1。这种底物净电荷的变化可使磷酸化的底物与非磷酸化的底物在琼脂糖凝胶上迅速分开。磷酸化的底物向阳极迁移,而非磷酸化的底物向阴极迁移(图 1)。PKC 特异的短肽底物 PepTag[®] C1 短肽的氨基酸序列是 P-L-S-R-T-L-S-V-A-A-K。PKA 特异的短肽底物 PepTag[®] A1 短肽的氨基酸序列是 L-R-R-A-S-L-G (Kemptide)。使用 PepTag[®]检测系统可以在 2 小时的时间内检测到低于 10 纳克的激酶。这就使快速筛选大量样品成为可能,例如筛选那些从多个层析柱组分中得来的样品。

PepTag[®]检测系统与其它非放射性的蛋白激酶检测系统相比有几个优势。磷酸化反应是否成功可以经过电泳分离步骤迅速确定。因为激酶的活性是用 PepTag[®]检测系统试剂盒所提供的有颜色的短肽的磷酸化来测定的,而样品中自然出现的其它底物的磷酸化不会增加测量到的激酶活性。因而与使用 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 相比,使用 PepTag[®]检测系统检测不完全纯化样品时背景很低甚至无背景。磷酸化短肽的定量可以用光密度扫描仪,分光光度计、96-孔酶标仪或荧光光度计来完成。图 2 和 3 所示的凝胶照片描述了用不同量的 PKC 和 PKA 所进行的对照反应(第 3.B 和 3.D 部分)。

PepTag[®]检测系统既可从不完全纯化样品、也可从纯化的酶制品中检测 PKC 或 PKA 活性,因此很适合用于对层析柱组分进行快速筛选或者筛选激酶激活剂或抑制剂的应用中。PepTag[®]检测系统提供了有活性的纯化的大鼠 PKC 或者小牛心脏 PKA 作为阳性对照。PKC 是用 Walton 等的方法纯化的(1),PKA 是用 Flockhart 和 Corbin 的方法纯化的(2)。

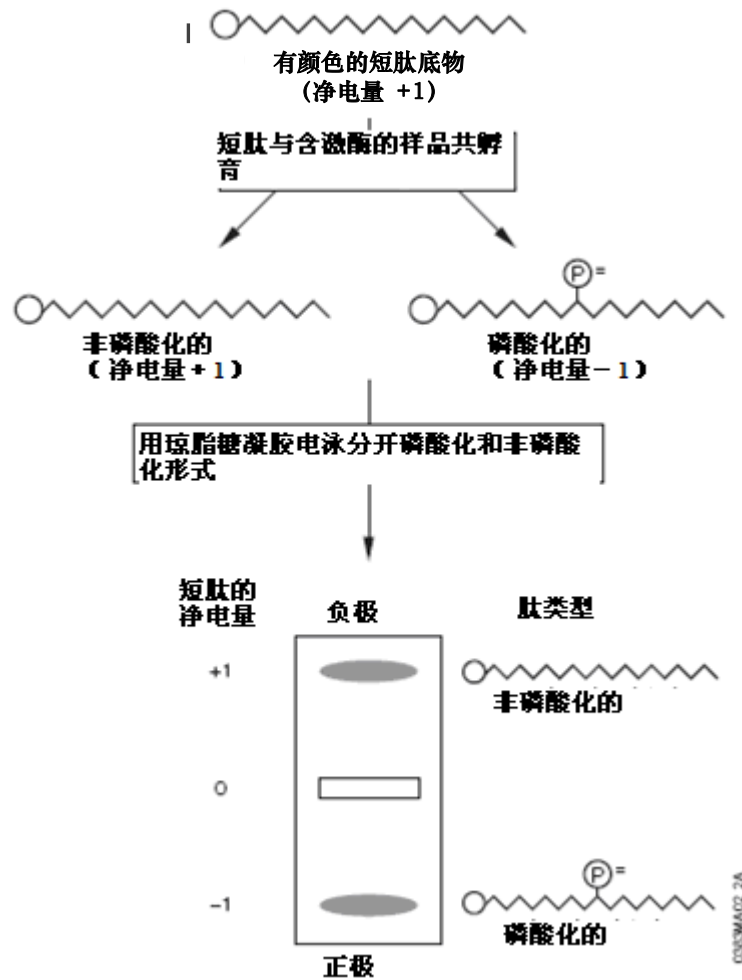


图1. PepTag® 非放射性蛋白激酶检测流程示意图。 只是示意图—真实数据见图2和3。

2. 产品组分和储存条件

产品	规格	目录号#
PepTag® Non-Radioactive PKC Assay	120 次	V5330

包括:


- 650µl PepTag® PKC 5X 反应缓冲液
- 650µl PKC Activator 5X Solution
- 20µl Protein Kinase C, 0.5µg (对照酶)
- 650µl PepTag® C1 短肽 (0.4µg/µl)
- 10ml 溶胶液
- 250µl 短肽保护液

产品	规格	目录号#
PepTag® Non-Radioactive cAMP-Dependent Protein Kinase Assay	120 次	V5340

包括:

- 650µl PepTag® PKA 5X 反应缓冲液
- 650µl PKA Activator 5X Solution
- 25µl cAMP-Dependent Protein Kinase, Catalytic Subunit, 2,500u (对照酶)
- 650µl PepTag® A1 短肽 (0.4µg/µl)
- 10ml 溶胶液
- 250µl 短肽保护液

储存条件: -70℃ 储存所有组分。反复冻融 Protein Kinase C 和 cAMP-Dependent Protein Kinase, Catalytic Subunit 会导致其活性丧失。如果在一次实验中不能用完所提供的对照酶，可以分装后于 -70℃ 储存。不要储存稀释的对照酶，这会导致活性丧失。

 不要储存稀释的对照酶。

3. PepTag® 定性检测的操作步骤

PepTag® 检测系统既可用于纯化的样品、也可用于不完全纯化的匀浆液。制备不完全纯化的匀浆液的方法有很多，而且匀浆液的来源也多种多样，例如鸡淋巴瘤 (3) 和大鼠脑 (1)。下面的操作步骤描述了在 Promega 使用的为 PKC 或 PKA 检测制备匀浆液的方法。

3.A. 为 PKC 检测制备组织或细胞样品

需要用户自备的材料

(在第 6.A 部分列有溶液配方)

- PKC 抽提液 (PKC extraction buffer)
- 含有200mM NaCl的PKC抽提液
- 磷酸盐缓冲液 (PBS)
- 1ml DEAE纤维素柱 (Whatman[®] DE52), 用PKC抽提液预先平衡
- 匀浆器 (例如, 用于组织样品的Polytron[®]匀浆器或类似的匀浆器, 以及用于培养细胞的Dounce匀浆器或类似的匀浆器)
- 小离心机, 转速可达到14,000 × g

1. 在 0-4℃ 预冷匀浆器和 PKC 抽提液。
2. **组织:** 用预冷的匀浆器 (如 Polytron[®] 匀浆器) 在 5ml 预冷的 PKC 抽提液中将 1g 组织匀浆。

培养的细胞: 用磷酸盐缓冲液 (PBS; 每100mm培养皿用5ml) 洗 5×10^6 到 1×10^7 的细胞, 然后吸干净缓冲液。在 0.5ml 冰冷的 PKC 抽提液中把细胞悬浮, 然后用预冷的匀浆器 (如 Dounce 匀浆器) 把细胞匀浆。

注意: 粗提物应该在制备的当天检测以便保持最大的活性, 获得最佳的结果。

3. 在 4℃, 用 14,000 × g 离心裂解液 5 分钟, 保存上清。
4. 用 PKC 抽提液预平衡 1ml 的 DEAE 纤维素柱, 再把第 3 步中得到的上清过柱。用 5ml 的 PKC 抽提液洗柱子, 然后用 5ml 含有 200mM NaCl 的 PKC 抽提液洗脱含有 PKC 的组分。继续进行第 3.B 部分。

3.B. PKC 检测操作步骤

需要用户自备的材料

(在第 6.A 部分列有溶液配方)

- PKC 稀释液
 - 水平的凝胶电泳设备
 - 甘油, 80%
 - Tris-HCl, 50mM (pH8.0)
 - 探头式超声波破碎仪
1. 用 PKC 稀释液 (PKC dilution buffer) 将少量蛋白激酶 C (Promtein Kinase C) 稀释到 2.5μg/ml (稀释方法参考第 7 部分)。随试剂盒所附的产品信息中标有这个酶的初始浓度。稀释后的酶不能储存, 会丧失活性。
 2. 用探头式超声波破碎仪超声处理 PKC Activator Solution 20-30 秒, 或直到溶液变温暖。

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司. 北京市东城区北三环东路 36 号. 环球贸易中心 B 座 907-909.
邮编 100013. 电话: 800 810 8133, 58256268 www.promega.com.cn

CTB132

根据英文 TB132 (5/09) 编译

注意：PKC Activator 5X Solution 含有磷脂，会聚集形成微胶团（micelles），因而必须用探头超声波破碎仪打碎微团胶，以最大程度地激活 PKC。使用涡旋振荡器或水浴超声波破碎仪都不能充分打碎磷脂微胶团。

- 对每一个样品，按照下面所列顺序在 0.5ml 小离心管中混合 PepTag[®] PKC 5X Buffer、PepTag[®] C1 Peptide、超声过的 PKC Activator 5X Solution 和水。在样品加入之前，小离心管一直要放在冰上。阴性对照将用于对反应进行定量时确定其摩尔吸收值（第 4 部分）。

如果是不完全纯化的样品，见**注意 1**。

标准 PKC 检测

PepTag [®] PKC Reaction 5X Buffer (注意 2)	5μl
PepTag [®] C1 Peptide (0.4μg/μl)	5μl
PKC Activator 5X Solution, 超声处理的 (注意 2)	5μl
短肽保护液 (非必须)	1μl
样品 (第 4 步的)	<u>1–10μl</u>
去离子水使终体积为	25μl

PKC 阳性对照检测

PepTag [®] PKC Reaction 5X Buffer (注意 2)	5μl
PepTag [®] C1 Peptide (0.4μg/μl)	5μl
PKC Activator 5X Solution, 超声处理的 (注意 2)	5μl
短肽保护液 (非必须)	1μl
Protein Kinase C (2.5μg/ml 溶于 PKC dilution buffer) (第 4 步的)	<u>4μl</u>
去离子水使终体积为	25μl

PKC 阴性对照检测 (不加 PKC)

PepTag [®] PKC Reaction 5X Buffer (注意 2)	5μl
PepTag [®] C1 Peptide (0.4μg/μl)	5μl
PKC Activator 5X Solution, 超声处理的 (注意 2)	5μl
短肽保护液 (非必须)	<u>1μl</u>
去离子水使终体积为	25μl

- 在 0 时间点，把一支管子从冰上移到 30°C 水浴中孵育 2 分钟。然后加入样品或蛋白激酶 C 在 30°C 再孵育 30 分钟（见**注意 2**）。

- 把管子放进开水浴或 95°C 加热块 10 分钟以终止反应。在凝胶电泳前把样品一直避光存放

普洛麦格（北京）生物技术有限公司，北京市东城区北三环东路 36 号，环球贸易中心 B 座 907–909。
邮编 100013。电话：800 810 8133，58256268 www.promega.com.cn

CTB132

根据英文 TB132 (5/09) 编译

在 4°C 或 -20°C。

6. 把样品上样到胶上之前，往每个样品中加进 1 μ l 的 80%甘油，以确保样品保留在上样孔中（第 3F 部分）。

注意：

1. 如果使用半纯化的匀浆液，最好加 1 μ l 短肽保护液或蛋白酶抑制剂，以防短肽降解。蛋白酶抑制剂的终浓度分别是：PMSF:0.1-1mM, E-64:1-10 μ M, 或 leupeptin:10-100 μ M。PMSF 不可逆地抑制丝氨酸蛋白酶；E-64 不可逆地抑制半胱氨酸蛋白酶；leupeptin 可逆抑制胰岛素类丝氨酸蛋白酶和某些半胱氨酸蛋白酶。参考文献 4 中有更多的关于蛋白酶抑制剂的特异性和制备方法的信息。
2. 第 6.A 部分列有 PepTag[®] PKC Reaction 5X Buffer 和 PKC Activator 5X Solution 的配方，便于与其它用在放射性检测中的缓冲液和激活液作比较。试剂盒提供的反应缓冲液和激活液可以使 C1 短肽在 PKC 的作用下磷酸化。尽管如此，如果在某个特定的体系中，以前有经验表明，其它的试剂浓度或者成分效果更佳，那么也可以改变缓冲液或激活液的配方，或用另一种缓冲液或激活液替代。在 25 μ l 反应体系中，反应缓冲液或激活液的体积不应超过 5 μ l，以确保其它成分的浓度不受影响。
3. 当 PKC(Cat.# V5261)在 0-20ng 范围内时，30 分钟的反应时间内磷酸化与 PKC 活性之间呈线性关系。如果激酶的大致浓度在上述范围之外时，可以通过调整孵育时间来保证线性关系。然而，PKC 在 30°C 时很不稳定，因此应该尽量保持最短的反应时间以避免酶在检测过程中降解。

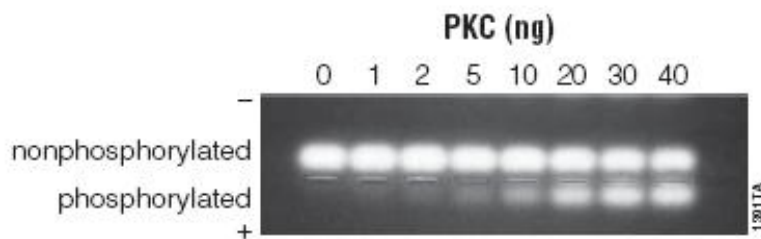


图2. 蛋白激酶C的检测。 两微克PepTag[®] C1短肽按照前述的标准(第3.B部分)PKC检测与PKC共孵育：PKC 的量在0-40ng之间变动，反应终体积为25 μ l，室温孵育30 分钟。95 °C加热10分钟终止反应。在0.8% 琼脂糖凝胶上以100V电泳15分钟分开样品。磷酸化的短肽向阳极(+)迁移，而非磷酸化的短肽向阴极(-)迁移。在透照仪(transilluminator)上给胶拍照。

3.C. 为 PKA 检测准备组织或细胞样品

需要用户自备的材料

(在第 6.A 部分列有溶液配方)

- PKA 抽提液 (PKA extraction buffer)
- 磷酸盐缓冲液 (PBS)
- 匀浆器 (例如, 用于组织样品的Polytron[®]匀浆器或类似的匀浆器, 或者用于培养细胞的Dounce匀浆器或类似的匀浆器)。
- 小离心机, 转速可达到14,000 × g。

1. 在 0-4°C 预冷匀浆器和 PKA extraction buffer。
2. **组织:** 用预冷的匀浆器 (如 Polytron[®]匀浆器) 在 5ml 预冷的 PKA extraction buffer 中匀浆 1g 组织。

培养的细胞: 用磷酸盐缓冲液 (PBS; 每100mm培养皿用5ml) 洗 5×10^6 到 1×10^7 的细胞, 然后吸走缓冲液。在 0.5ml 冰冷的 PKA extraction buffer 中悬浮细胞, 然后用冰冷的匀浆仪 (如 Dounce 匀浆仪) 匀浆。

注意: 粗提物应该在制备的当天检测以便保持最大的活性, 获得最佳的结果。

3. 在 4°C, 14,000 × g 离心裂解液 5 分钟, 保存上清。继续进行第 3.D 部分。

3.D. PKA 检测操作步骤

需要用户自备的材料

(溶液配方见第 6.A 部分)

- PKA 稀释液 (PKA dilution buffer)
 - 水平的凝胶电泳设备
 - 甘油, 80%
 - Tris-HCl, 50mM (pH8.0)
 - 于 50mM Tris-HCl (pH8.0) 中配制的 0.8% 琼脂糖
1. 用 PKA 稀释液 (PKA dilution buffer) 将少量依赖于 cAMP 的蛋白激酶催化亚单位 (Protein Kinase, Catalytic Subunit) 稀释到 2μg/ml。随试剂盒所附的产品信息中标有这个酶的初始浓度。稀释后的酶不能储存, 会丧失活性。
 2. 对每一个样品, 按照下面所列顺序在 0.5ml 小离心管中混合 PepTag[®] PKA Reaction 5X Buffer、PepTag[®] A1 Peptide、PKA Activator 5X Solution 和水。在样品加入之前, 小离心管一直要放在冰上。阴性对照是在对反应进行定量时确定摩尔吸收值用的第 4 部分)。

注意: 对不完全纯化的酶样品, 参看**注意 1**。

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司. 北京市东城区北三环东路 36 号. 环球贸易中心 B 座 907-909.
邮编 100013. 电话: 800 810 8133, 58256268 www.promega.com.cn

CTB132

根据英文 TB132 (5/09) 编译

依赖于 cAMP 的蛋白激酶 (PKA) 标准检测

PepTag [®] PKA Reaction 5X Buffer (注意 2)	5μl
PepTag [®] A1 Peptide (0.4μg/μl)	5μl
PKA Activator 5X Solution, (注意 2)	5μl
短肽保护液 (非必须)	1μl
样品 (第 3 步)	<u>1–10μl</u>
去离子水使终体积为	25μl

PKA 阳性对照检测

PepTag [®] PKA Reaction 5X Buffer (注意 2)	5μl
PepTag [®] A1 Peptide (0.4μg/μl)	5μl
PKA Activator 5X Solution, (注意 2)	5μl
短肽保护液 (非必须)	1μl
cAMP 依赖的蛋白激酶催化亚单位 (在 PKA dilution buffer 中, 浓度是 2μg/ml; 第 3 步)	<u>5μl</u>
去离子水使终体积为	25μl

PKA 阴性对照检测 (不加 PKA)

PepTag [®] PKA Reaction 5X Buffer (注意 2)	5μl
PepTag [®] A1 Peptide (0.4μg/μl)	5μl
短肽保护液 (非必须)	1μl
PKA Activator 5X Solution (注意 2)	<u>5μl</u>
去离子水使终体积为	25μl

3. 在 0 时间点, 把管子从冰上移到 30°C 水浴中孵育 1 分钟。然后加入样品或依赖于 cAMP 的蛋白激酶催化亚单位, 在室温再孵育 30 分钟 (**注意 3**)。
4. 把管子放进开水浴或 95°C 加热块 10 分钟以终止反应。在凝胶电泳前把样品一直避光存放在 4°C 或 -20°C。
5. 把样品上样到胶上之前, 往每个样品中加进 1μl 的 80% 甘油, 以确保样品保留在上样孔中 (第 3.F. 部分)。

注意:

1. 如果使用不完全纯化的匀浆液, 最好加 1μl 短肽保护液或蛋白酶抑制剂, 以防短肽降解。蛋白酶抑制剂的终浓度分别是: PMSF:0.1-1mM, E-64:1-10μM, 或 leupeptin:10-100μM。PMSF 不可逆地抑制丝氨酸蛋白酶; E-64 不可逆地抑制半胱氨酸蛋白酶; leupeptin 可逆抑

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司. 北京市东城区北三环东路 36 号. 环球贸易中心 B 座 907-909.
 邮编 100013. 电话: 800 810 8133, 58256268 www.promega.com.cn

CTB132

根据英文 TB132 (5/09) 编译

制胰岛素类丝氨酸蛋白酶和某些半胱氨酸蛋白酶。参考文献 4 中有更多的蛋白酶抑制剂的特异性和制备方法。

- 第 6.A 部分列有 PepTag[®] PKA Reaction 5X Buffer 和 PKA Activator 5X Solution 的配方，便于与其它用在放射性检测中的缓冲液和激活液作比较。试剂盒提供的反应缓冲液和激活液可以使 PepTag[®] A1 短肽在 PKA 的作用下被磷酸化。尽管如此，如果在某个特定的体系中，以前有经验表明不同的试剂浓度或者不同的成分效果更佳，那么也可以改变缓冲液或激活液的配方或用另一种缓冲液或激活液替代。在 25 μ l 反应体系中，反应缓冲液或激活液的体积不应超过 5 μ l，以确保其它成分的浓度不受影响。
- 当 PKA(Cat.# V5161)在 0-16ng 范围内时，在 30 分钟的反应时间内，磷酸化与 PKA 活性之间呈线性关系。如果在实验中激酶的大致浓度在上述范围之外时，可以通过调整孵育时间来保证线性关系。然而，PKA 在室温条件下很不稳定，因此**应该尽量保持最短的反应时间以避免在检测过程中酶的降解。**

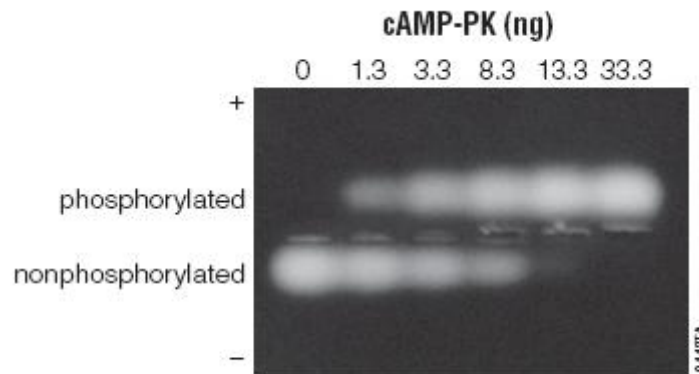


图3. 检测依赖于cAMP的蛋白激酶的活性。两微克PepTag[®] A1短肽按照前述标准PKA反应进行孵育(第3.D.部分)：PKA 的量在1.3–33.3ng之间变动，反应终体积为25 μ l，室温孵育30 分钟。95 $^{\circ}$ C加热10分钟以终止反应。在0.8% 琼脂糖凝胶上以100V电泳15分钟分离样品。磷酸化的短肽向阳极(+)迁移，而非磷酸化的短肽向阴极(-)迁移。在透照仪(transilluminator)上给胶拍照。

3.E. 凝胶的制备

1. 按照制造商的说明安装水平琼脂糖凝胶装置。如果只用一个梳子，那么把它置于胶模的中间。如果使用不止一个梳子，那么在各个梳子之间要保持至少 1 英寸的距离。

注意：如果要同时读取多个样品，可以在一块胶中放置两个或更多的梳子以加倍每块中的样品数，但梳子之间要保持至少 1 英寸的距离。

2. 在 50mM Tris-HCl (pH 8.0) 中配制 0.8% 琼脂糖溶液。加热至琼脂糖完全溶解。待琼脂糖溶液冷却至 60°C 左右时，将溶液倒入制胶板中。静置 20 分钟左右使凝胶完全凝固（凝固所需的时间可能会随使用琼脂糖类型的不同而有所变化；见**注意**）。一块 7 X 10cm 的胶需要 30ml 的琼脂糖溶液。一块 10 X 15cm 的胶需要 70ml 的琼脂糖溶液。也可以使用厚一点的胶，但这可能会使切胶后琼脂糖体积过大而产生问题。对较大或较小的胶，可根据胶的大小来相应调整琼脂糖的体积。
3. 如果在几个小时内都不会使用凝胶，在胶上覆盖一薄层 50mM Tris-HCl (pH 8.0)，室温保存。

注意：

1. 使用的琼脂糖类型可能会影响检测结果。这里描述的操作程序假定用的是标准熔点琼脂糖。低熔点琼脂糖也是有效的，但是凝胶会更软而且当放在温热的表面（如密度扫描仪）时容易溶解。
2. 凝胶中琼脂糖浓度的变化对短肽的迁移或分辨率几乎没有影响。操作步骤中描述的浓度，0.8%，使凝胶具有足够的硬度以便操作而且溶解也容易。

3.F. 电泳分离磷酸化与非磷酸化的 PepTag[®]短肽

1. 轻轻地从凝固的 0.8% 琼脂糖凝胶中拔出梳子。把制胶板放进电泳槽中。加入 50mM Tris-HCl (pH 8.0) 溶液使其充满加样孔并且完全没过胶面。
2. 把样品加入加样孔中。最后一个样品加入孔中后，立即用 100V 电压电泳 15-18 分钟或直至出现明显的条带分离。如果条带很弱，可以放到紫外灯下观察。
3. 电泳完成后，如果愿意，可以把凝胶从电泳槽中取出、拍照。尽管用肉眼就可以看到有颜色的 PepTag[®] 短肽条带，但是在紫外灯下给胶拍照会得到更好的灵敏度。

至此，定性检测就结束了。通过在紫外灯下检查凝胶，可以确定哪些样品有蛋白激酶活性而且可以对样品中激酶的相对活性量做一个定性的估计。如要对激酶活性进行定量，就需要继续进行第 4 部分中的操作方案之一。

注意：

1. 为了尽量避免扩散，加样要尽可能快，同时防止样品溢出。
2. 电压可在 60—140V 之间变动，不会明显改变 PepTag[®] 短肽的迁移性。样品中的高盐浓度可能会阻碍短肽的迁移。在这种情况下，凝胶电泳的时间应稍长一些以使所有的产物都完全离孔。

4. PepTag® 检测结果的定量

利用分光光度技术、光密度扫描计量法及荧光分光光度法均可以检测出磷酸化和非磷酸化的短肽在量上的差异，因而可以用来定量激酶活性。不管使用哪种方法，一定要在电泳结束 10 分钟之内开始定量，以避免 PepTag® 短肽扩散到周围的琼脂糖中。

我们建议在把目的条带从胶中切出来之前先拍照。如果样品数量太多，不易操作，可以在多个胶上跑样品，错开电泳起始时间。当定量激酶活性时，有必要做一个含有 5 μ l PepTag® 短肽但不加激酶的阴性对照（第 3.B. 及 3.D. 部分）。这个对照是用来测定您系统中染料的确切的摩尔吸收系数的。

4.A. 通过分光光度法定量

用户需自备的材料

- 冰乙酸
1. 用剃刀刀片或手术刀把带负电荷的磷酸化条带从胶上切下来，要保持总体积一致，大约 250 μ l（注意 1）。把每个切出来的条带放进一个 1.5ml 的有刻度的小离心管中，95 $^{\circ}$ C 加热直到胶条熔化。如果胶条的体积大大低于 250 μ l，那么用水稀释使之达到 250 μ l。
 2. **96 孔板：**将 125 μ l 上述热琼脂糖转移到一个装有 75 μ l 溶胶液（事先平衡到室温并混匀）和 50 μ l 冰乙酸的管中。快速涡旋振荡后，转移 250 μ l 至 96 孔板的一个孔中。琼脂糖一旦置于酸化的溶胶液中，可以保持液态达几小时（注意 2）。当把所有样品都转移到板中后，在 570nm 波长读吸光度值。用不含 PepTag® 短肽的液态琼脂糖做空白清零。
 3. **比色皿：**将 175 μ l 上述热琼脂糖转移到一个装有 75 μ l 溶胶液（事先平衡到室温并混匀）、100 μ l 冰乙酸和 150 μ l 蒸馏水的管中。琼脂糖一旦置于酸化的溶胶液中，可以保持液态达几小时。涡旋振荡，然后转移这 500 μ l 溶液至一 0.5ml 比色皿中。在 570nm 波长读吸光度值。用不含 PepTag® 短肽的琼脂糖做空白清零。比色皿用过后可以用水清洗。溶胶液中的成分不会损坏玻璃比色皿。



如果 A₅₇₀ 的读数太低或太高，提高或降低样品的稀释度使其处于酶活性的线性范围内。

注意：

1. 切胶速度要尽可能迅速以避免在关闭电源后样品扩散。我们推荐使用有刻度的微量离心管以便于测量胶条的体积。要确保胶条的体积 \leq 250 μ l。
2. 加热后，液化的琼脂糖可能在加入乙酸和溶胶液之前重新凝固。如果出现这种情况，再加热胶条直至熔化。

4.B. 活性的计算

一个单位的激酶活性定义为在每分钟内每毫升样品中转移到底物上的纳摩尔磷酸数。每个短肽有一个磷酸化位点；因此，存在于带负电荷的磷酸化条带中的短肽的摩尔数与转移的磷酸的摩尔数是相等的。磷酸化的短肽的摩尔数可以用比尔定律（Beer's Law）来计算。比尔定律如下所示：

$A = \epsilon BC$, 在此:

A = 样品的吸光度;

ϵ = 短肽的摩尔吸收系数 ($L/mol \cdot cm^{-1}$);

B = 光径的宽度;

C = 读取的样品中短肽的浓度 (mol/L)。

表1列出了进行计算所需的其它信息。

Table 1. PepTag[®] 短肽的特性。

短肽	分子量	在所描述反应中的 纳摩尔数(2 μ g)
PepTag [®] A1 短肽	1,314g/mol	1.522nmol
PepTag [®] C1短肽	1,684g/mol	1.187nmol

1. 根据吸光度读值计算 PepTag[®] 短肽的摩尔吸收系数 (ϵ)：首先计算阴性对照中非磷酸化的短肽浓度，然后运用比尔定律。

注意：吸光度读数仅仅是以比色皿或孔中存在的特定百分比的短肽为基础的。如果您使用分光光度计，按照第 4.A 部分的步骤进行操作，那么需调整吸光度读数，修正系数是 1.43（250 μ l 熔化的凝胶条带，使用了 175 μ l）或者 2（250 μ l 熔化的凝胶条带，使用了 125 μ l）。

例如：下面的例子中，熔化的琼脂糖体积为 250 μ l，但只用了 125 μ l 的胶条来定量。阴性对照实验中用了两微克的 PepTag[®] A1 短肽，全部反应产物都上样到了胶中。琼脂糖凝胶条带熔化后，一半用来做分光光度测量。比色皿中溶液的终体积为 0.5ml，光径的宽度为 1cm，在 570nm 波长测得的吸光度值 (A) 是 0.157。

$C = (\text{摩尔数}) \div \text{以升为单位的体积数}$

$$C = (1.522 \times 10^{-9}) \div (500 \times 10^{-6}L) = 3.044 \times 10^{-6}mol/L$$

运用比尔定律，来计算 ϵ ：

$$A = \epsilon BC, \epsilon = A/BC$$

$$A = 0.157$$

$$B = 1\text{cm}$$

$$C = 3.044 \times 10^{-6}\text{mol/L}$$

$$\varepsilon = (0.157 \times 2) \div (1\text{cm} \times 3.044 \times 10^{-6}\text{mol/L})$$

$$\varepsilon = 103,150\text{L/mol} \cdot \text{cm}^{-1}$$

2. 下一步，确定磷酸化的 PepTag® 短肽的浓度（C），以摩尔/升为单位。

例如：一个磷酸化的条带在570nm波长的吸光度值是0.0215。从前面的计算中已知摩尔吸收系数为103,150L/mol·cm⁻¹。

$$A = \varepsilon BC, \quad C = A/\varepsilon B$$

$$A_{570} = 0.0215$$

$$\varepsilon = 103,150\text{L/mol} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$B = 1\text{cm}$$

$$C = (0.0215) \div (103,150\text{L/mol} \cdot \text{cm}^{-1} \times 1\text{cm}) = 2.08 \times 10^{-7}\text{mol/L}$$

3. 计算样品中磷酸化的短肽的摩尔数，该数值为浓度（C；来自第2步）与比色皿或孔中的体积（V）的乘积。

例如：读数的样品的体积为500μl。

$$C \times V = \text{number of moles in the sample}$$

$$C = 2.08 \times 10^{-7}\text{mol/L}$$

$$V = 500 \times 10^{-6}\text{L}$$

$$(2.08 \times 10^{-7}\text{mol/L})(500 \times 10^{-6}\text{L}) = 104\text{pmol}$$

4. 通过合适的稀释因子来调整第3步中测定的浓度，以确定琼脂糖胶条中磷酸化短肽的总量。如果检测按前面描述的进行，那么这个数值应该是2（250μl熔化的琼脂糖条带）。

例如：胶条的一半用于定量。

$$104\text{pmol} \times 2 = 208\text{pmol}$$

注意：每个短肽上有一个磷酸化位点；因此，存在于带负电荷的磷酸化条带中的短肽的摩尔数即是转移的磷酸的摩尔数。

5. 计算反应中激酶活性的单位数。一单位的激酶是在每分钟内每毫升样品中转移到底物上的磷酸的纳摩尔数。

要确定单位数，首先要把反应中的摩尔数除以反应时间。然后再把这个数值除以加到反应中的样品体积。

例如：反应的孵育时间为30分钟，最初的样品体积为10μl。

$$\frac{208\text{pmol}}{30\text{min}} = 6.93\text{pmol}/\text{min} = 0.00693\text{nmol}/\text{min}$$

$$\frac{0.00693\text{nmol}}{10 \times 10^{-3}\text{ml}} = 0.693\text{units}/\text{ml}$$

4.C. 通过光密度扫描法定量

完整的琼脂糖凝胶可以用光密度扫描仪在约 570nm 波长进行扫描分析。但是，由于市场上的光密度扫描仪可能存在着差异，所以我们无法推荐一个具体的扫描操作流程。请联系您使用的光密度扫描仪的制造商以获取这方面的信息。如果计划使用光密度扫描法定量，那么很重要的一点是琼脂糖凝胶电泳的时间要长一些，使有颜色的条带迁移到离中心加样孔远一些的地方。加样孔能够导致扫描有颜色的条带时失真。如果来自加样孔的干扰无法排除，可以试着从加样孔的两侧扫描凝胶条带。操作时要注意不要因光密度扫描仪过热而导致凝胶软化变形。

注意：电泳结束后要尽快进行光密度扫描分析以避免条带扩散。

4.D. 通过荧光分光光度法定量

因为短肽在荧光下亮度比可见光下强得多，所以用荧光分光光度法定量检测蛋白激酶活性灵敏度最高。使用这种方法可以检测出低于纳克级的激酶。图 4 和 5 显示了 PepTag[®] A1 短肽的激发和发射光谱。表 2 提供了 PepTag[®] 短肽的最大激发和发射波长。

当用荧光分光光度计进行定量时，按照分光光度计的操作流程（第 4.A 部分）进行切胶、融化及溶胶。然后用蒸馏水稀释 500 μl 溶液使其达到仪器所要求的体积。由于荧光分光光度计有多种多样，所以我们无法推荐一个通用的操作流程。请与您的制造商联系以获取这方面的信息。

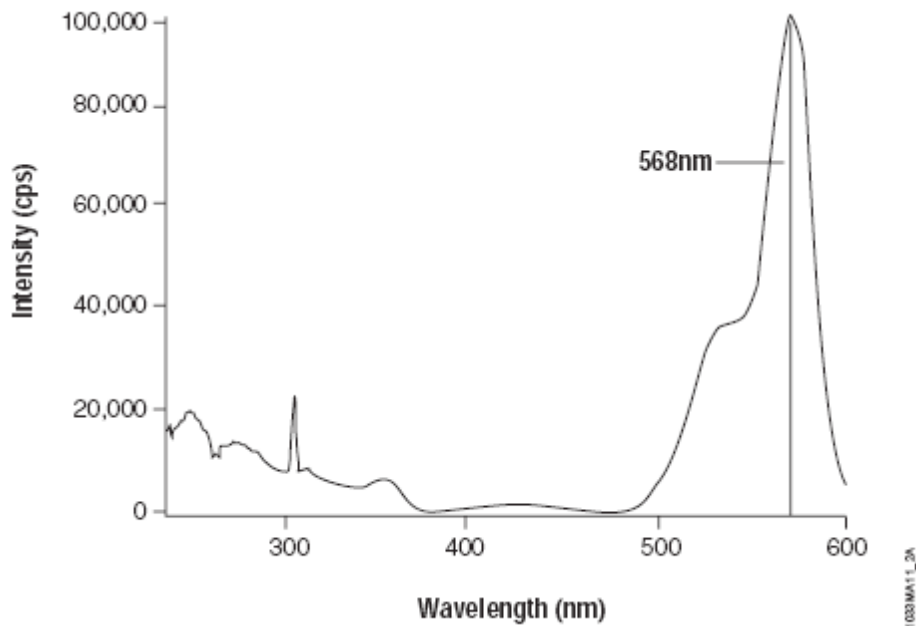


图4. PepTag[®] A1短肽的激发光谱。PepTag[®] A1短肽的激发光谱是用 Spex Fluorograph (model 1680 0.22 μ m双分光光度计)，在610nm发射波长测读的。五微克的PepTag[®] 短肽用含3.75%溶胶液和5%乙酸的水稀释至2ml后进行测读。激发峰值在560nm出现，540nm处伴随有一肩峰。

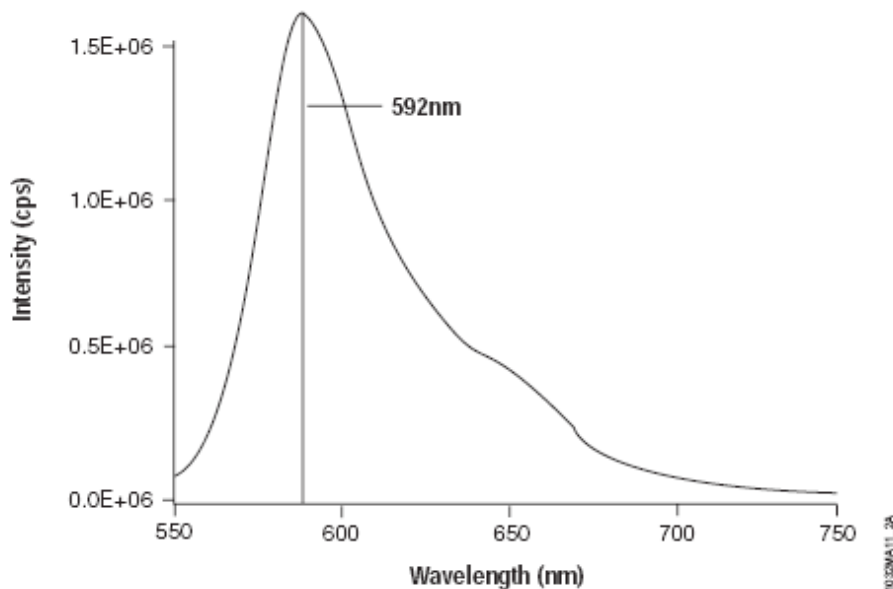


图5. PepTag[®] A1短肽的发射光谱。PepTag[®] A1短肽的发射光谱是用Spex Fluorograph，按图4所述测读的，唯一不同之处是激发波长为540nm。

表 2. PepTag® 短肽 (A1 或 C1) 的激发和发射波长

最大激发波长	568nm
最大发射波长	592nm*

***注意:** 由于 PepTag® 短肽的荧光水平很高, 在 560nm 的激发可能会引起发射读数太高而不呈线性。这时使用 540nm 作为激发波长获得的定量数值更好。

5. 参考文献

1. Walton, G.M. *et al.* (1987) A three-step purification procedure for protein kinase C: Characterization of the purified enzyme. *Anal. Biochem.* **161**, 425–37.
2. Flockhart, D.A. and Corbin, J.D. (1984) In: *Brain Receptor Methodologies, Part A*, Marangos, P.J. *et al.*, eds., Academic Press, Orlando, FL, 209.
3. Litchfield, D.W. *et al.* (1992) Phosphorylation of casein kinase II by p34cdc2 in vitro and at mitosis. *J. Biol. Chem.* **267**, 13943–51.
4. North, M.J. (1989) In: *Proteolytic Enzymes*, Beynon, R.J. and Bond, J.S., eds., IRL Press, Oxford, UK.
5. Goueli, B.S. *et al.* (1995) A novel and simple method to assay the activity of individual protein kinases in a crude tissue extract. *Anal. Biochem.* **225**, 10–7.

6. 附录

6.A. 缓冲液和溶液的配方

PepTag® A1 Peptide

L-R-R-A-S-L-G (Kemptide)
0.4µg/µl in water

PepTag® C1 Peptide

P-L-S-R-T-L-S-V-A-A-K
0.4µg/µl in water

PepTag® PKA Reaction 5X Buffer

100mM Tris-HCl (pH 7.4)
50mM MgCl₂
5mM ATP

PepTag® PKC Reaction 5X Buffer

100mM HEPES (pH 7.4)
6.5mM CaCl₂
5mM DTT
50mM MgCl₂
5mM ATP

phosphate-buffered saline (PBS)

0.2g/L KCl
8.0g/L NaCl
0.2g/L KH₂PO₄
1.15g/L Na₂HPO₄

PKA Activator 5X Solution

5µM cAMP 溶于水中

PKA dilution buffer

350mM K₃PO₄ (pH 6.8)
0.1mM DTT

普洛麦格(北京)生物技术有限公司. 北京市东城区北三环东路36号. 环球贸易中心B座907-909.
邮编 100013. 电话: 800 810 8133, 58256268 www.promega.com.cn

CTB132

根据英文 TB132 (5/09) 编译

PKA extraction buffer (见参考文献 5)

25mM Tris-HCl (pH 7.4)

0.5mM EDTA

0.5mM EGTA

10mM β -mercaptoethanol

1 μ g/ml leupeptin

1 μ g/ml aprotinin

4 °C 储存, 或在-20 °C 储存 (至多6个月)。

使用前, 每100ml的PKA extraction buffer

加入0.5ml PMSF 储存液 (100mM

PMSF in 100% ethanol)。

PKC Activator 5X Solution

1mg/ml phosphatidylserine in water

PKC dilution buffer

100 μ g/ml bovine serum albumin

(BSA)

0.05% Triton® X-100

PKC extraction buffer

25mM Tris-HCl (pH 7.4)

0.5mM EDTA

0.5mM EGTA

0.05% Triton® X-100

10mM β -mercaptoethanol

1 μ g/ml leupeptin

1 μ g/ml aprotinin

4 °C 储存, 或在-20 °C 储存 (至多6个月)。

使用前, 每100ml的PKC extraction buffer

加入0.5ml PMSF 储存液 (100mM

PMSF in 100% ethanol)。

6.B. 相关产品

产品	规格	目录号
SignaTECT® Protein Kinase C (PKC) Assay System	96次反应	V7470
SignaTECT® cAMP-Dependent Protein Kinase (PKA) Assay System	96次反应	V7480
SignaTECT® DNA-Dependent Protein Kinase Assay System	96次反应	V7870
SignaTECT® Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase (CaM KII) Assay System	96次反应	V8161
SignaTECT® cdc2 Protein Kinase Assay System	96次反应	V6430
SignaTECT® Protein Tyrosine Kinase Assay System	96次反应	V6480
cAMP-Dependent Protein Kinase, Catalytic Subunit	2,500u	V5161
InCELLect® AKAP St-Ht31 Inhibitor Peptide	150 μ l	V8211
InCELLect® St-Ht31P Control Peptide	150 μ l	V8221
Kemptide (PKA) Peptide Substrate	1mg	V5601
cAMP-Dependent Protein Kinase Peptide Inhibitor	1mg	V5681
PMA	5mg	V1171
4 α -PMA	1mg	V1181
LY 294002	5mg	V1201
Neurogranin(28-43) (PKC) Peptide Substrate	1mg	V5611
Myristoylated Protein Kinase C Peptide Inhibitor	1mg	V5691
Protein Kinase C	1 μ g	V5261

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司, 北京市东城区北三环东路 36 号, 环球贸易中心 B 座 907-909, 邮编 100013. 电话: 800 810 8133, 58256268 www.promega.com.cn

CTB132

根据英文 TB132 (5/09) 编译

7. 实验小提醒

- 关于 V5340, PKA 检测试剂盒

1. 怎样配制 PKA Dilution Buffer?

配制 350mM 的 K_3PO_3 (pH6.8):

1M K_2HPO_4 17.395 ml

1M KH_2PO_4 17.605 ml

然后加入 1.542mg DTT (或者使用 Promega 的 100mM DTT, 目录号 P1171), 用蒸馏水定容到 100ml。

注: K_3PO_3 缓冲液是参照《分子克隆》(“Molecular Cloning”, Sambrook and Russell) 第 3 版 A1.5 配制的。

2. 怎样稀释 PKA?

以 V516A 是 1.66mg/ml 为例, 建议按以下步骤稀释 PKA:

- 1) 1: 100 稀释到 16.6ng/ μ l。将 2 μ l 的 PKA 加到 198 μ l 的 PKA Dilution Buffer 中。
- 2) 1: 4.15 稀释到 4ng/ μ l。取 20 μ l 的 PKA (16.6ng/ μ l) 加入 63 μ l 的 Dilution Buffer 中。
- 3) 1: 1 稀释到 2ng/ μ l。取 50 μ l 的 PKA(4ng/ μ l)加入到 50 μ l 的 Dilution Buffer 中。

- 关于 V5330, PKC 检测试剂盒

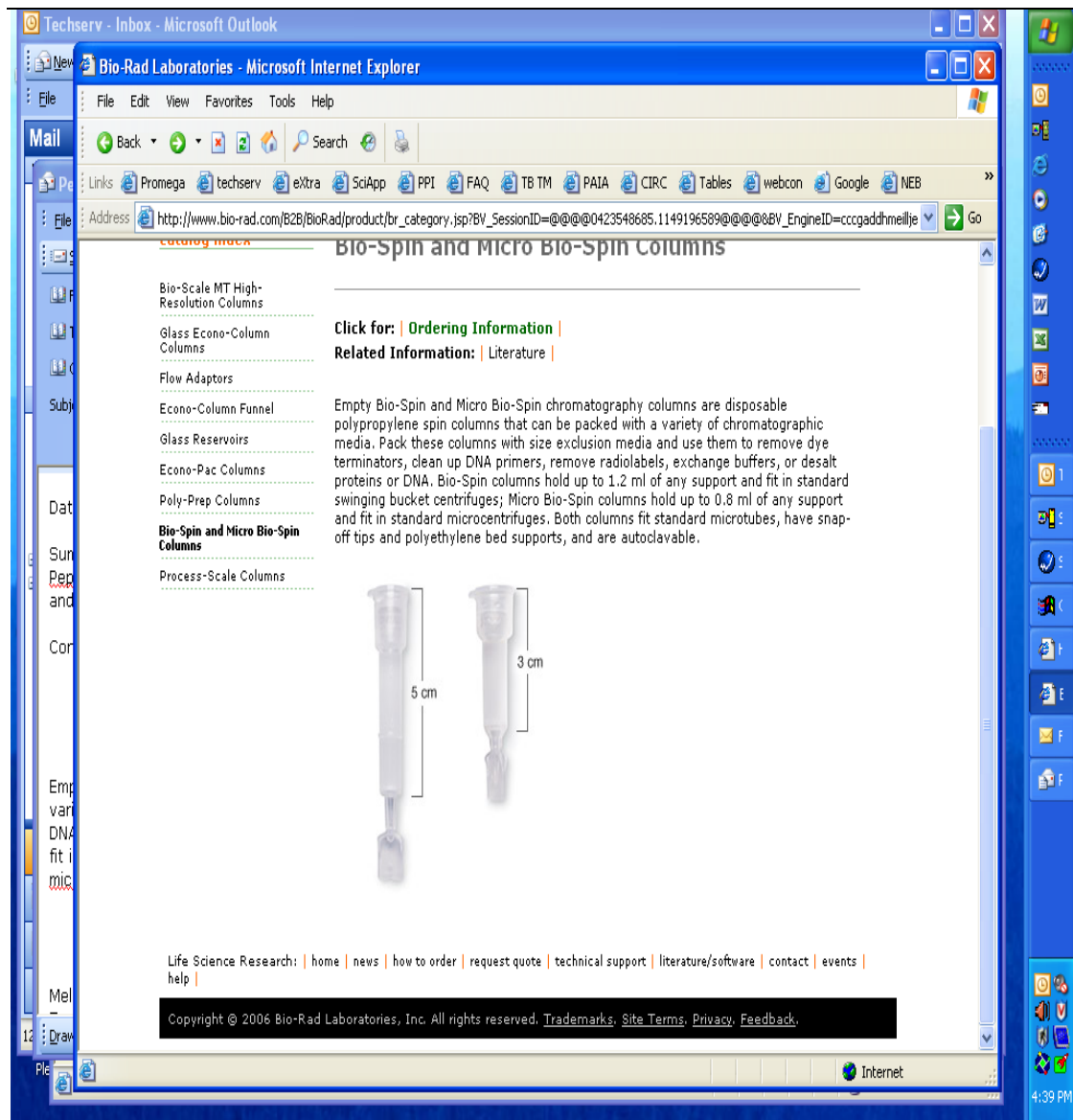
1. 哪种柱子可以用来做 PepTag PKC DEAE-纤维素柱纯化?

以下几种 Bio-Rad 的柱子都可以:

Catalog #732-6008 Bio-Spin Chromatography Columns, empty, 100 (holds up to 1.2 ml)

Catalog #732-6025 Bio-Spin Chromatography Columns, empty, 1,000 (holds up to 1.2 ml)

Catalog #732-6204 Micro Bio-Spin Chromatography Columns, empty, 100 (holds up to 0.8 ml)



2. 必须要用探头式超声波破碎仪（Probe Sonicator）超声处理 PKC Activator Solution 吗？

是的。PKC Activator 5X Solution 含有磷脂，会聚集形成微胶团（micelles）。因而必须用探头式超声波破碎仪打碎微团胶，以最大程度地激活 PKC。使用涡旋振荡器或水浴超声波破碎仪都不能充分打碎磷脂微胶团。