

产品目录号：
V9101
V9102
V9103

ADP-Glo™ 激酶检测



注意：这是节选操作步骤，详细英文说明书见 <http://www.promega.com/tbs/tb323/tb323.pdf>。
本简明操作步骤电子版见 www.promega.com.cn

2. 试剂盒组份和储存条件

产品	包装	目录号
ADP-Glo™ Kinase Assay	1,000次检测	V9101

这个试剂盒足够在384孔板上每个样品分别用5μl激酶反应、5μl ADP-Glo™ 试剂和10μl 激酶检测试剂进行总共1,000次反应。这个试剂盒也可在96孔板上用25μl:25μl:50μl 进行总共200次检测。包含：

- 5ml ADP-Glo™ Reagent
- 10ml Kinase Detection Buffer
- 1瓶 Kinase Detection Substrate (冻干粉)
- 500μl Ultra Pure ATP, 10mM
- 500μl ADP, 10mM

产品	包装	目录号
ADP-Glo™ Kinase Assay	10,000次检测	V9102

这个试剂盒足够在384孔板上每个样品分别用5μl, 5μl和10μl 的激酶反应、ADP-Glo™ 试剂和激酶检测试剂进行10,000次检测。这个试剂盒也可在96孔板上用25μl:25μl:50μl 进行总共2,000次检测。包含：

- 50ml ADP-Glo™ Reagent
- 100ml Kinase Detection Buffer
- 1瓶 Kinase Detection Substrate (冻干粉)
- 5ml Ultra Pure ATP, 10mM
- 5ml ADP, 10mM

产品	包装	目录号
ADP-Glo™ Kinase Assay	100,000次检测	V9103

这个试剂盒足够在384孔板上每个样品分别用5μl, 5μl和10μl 的激酶反应、ADP-Glo™ 试剂和激酶检测试剂进行100,000次检测。

测。这个试剂盒也可在96孔板上用25μl:25μl:50μl 进行总共20,000次检测。包含：

- 10x50ml ADP-Glo™ Reagent
- 10x100ml Kinase Detection Buffer
- 10瓶 Kinase Detection Substrate (冻干粉)
- 10x5ml Ultra Pure ATP, 10mM
- 10x5ml ADP, 10mM

储存条件：

3. 准备 ADP-Glo™ 激酶检测

请使用者准备：

- 全白多孔板
- 排枪或自动化加样工作站
- 激酶底物
- 激酶
- 化学发光仪 (luminometer)
- 摇板机



ADP-Glo™ 激酶检测

3.A. 制备激酶检测试剂

制备激酶检测缓冲液

1. 在室温融解 Kinase Detection Buffer, 观察是否有沉淀。
2. 如果出现沉淀,就在 37°C 孵育 Kinase Detection Buffer 15 分钟并经常摇动, 溶解沉淀。或者, 小心吸走上清, 去除沉淀。

制备激酶检测试剂

1. 使用前在室温平衡 Kinase Detection Buffer 和 Kinase Detection Substrate。
2. 将 Kinase Detection Buffer 全部倒进装有 Kinase Detection Substrate 的棕色瓶中, 使冻干粉底物溶解。这样就只成了激酶检测试剂。
3. 轻轻震荡、涡旋或颠倒混匀, 成为均质溶液。底物应在 1 分钟内溶解。
4. 激酶检测试剂配好后应立即使用, 或分装存于-20°C。我们认为配好的试剂经过几次冻融后循环信号活性都没有损失。

3.B.制作 ATP 转化成 ADP 的标准曲线

表 1. 用两个浓度系列, 在 ATP+ADP 混合物中含不同百分比 ATP 时得到的 Z' 值。

表 2 .标准曲线所代表的 ATP 到 ADP 的转化百分比

% ADP	100	80	60	40	20	10	5	4	3	2	1	0
% ATP	0	20	40	60	80	90	95	96	97	98	99	100

A T P到A D P 转化	1 0 u M A T P + A D P	5 0 0 u M A T P + A D P
1 %	0 . 7 6	0 . 6 5
5 %	0 . 8 2	0 . 8 4
1 0 %	0 . 9 0	0 . 8 6
2 0 %	0 . 8 8	0 . 9 2

为了估计在激酶反应中产生的 A D P 的量, 我们推荐做一条标准曲线, 荧光强度对应于 A T P 到 A D P 的转化 (A T P 到 A D P 转化曲线), 以激酶反应中用到的 A T P 浓度为基础。这些转化曲线代表一个反应中特定转化百分比 (表 2) 时存在的 A T P 和 A D P 的量。用于产生 A T P 转化 A D P 标准曲线的标准品由将一定体积的 A T P 和 A D P 母液混合而成 (表 3)。在操作步骤中, A T P 和 A D P 浓度的和称作 “A T P + A D P”。

1. 用 1 x kinase reaction buffer 稀释试剂盒提供的 Ultra Pure ATP 和 ADP, 制成 1ml 1mM ATP 和 500ul 1mM ADP。

⚠ 只用试剂盒提供的 Ultra Pure ATP 进行 ADP-Glo™ 激酶检测。其他来源的 ATP 可能混有 ADP, 导致高背景。

2. 在 96 孔板的孔 B1-B12, C1-C12 和 D1-D12 中, 加入 90ul 的 1xkinase reaction buffer。

3. 将第 1 步配好的 1mM ATP 和 1mM ADP 溶液按表 3 所示在孔 A1-A12 中混合, 模拟每个转化百分比 (见表 2) 的 ATP 和 ADP 的浓度。混合好。这是 1mM 系列。



ADP-Glo™ 激酶检测

表 3. 制备 1mM 系列 ATP+ADP 标准品

孔号	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
1mM ADP (ul)	100	80	60	40	20	10	5	4	3	2	1	0
1mM ATP (ul)	0	20	40	60	80	90	95	96	97	98	99	100

- 在孔 A1-A12 中, 以下列方式稀释样品: 从 A1 转移 10ul 样品到 B1, 10ul 从 A2 到 B2。混合好。这是 100uM 系列。
- 在 B1-B12 孔中, 以下列方式稀释样品: 从 B1 取 10ul 到 C1, 从 C2 取 10ul 到 D2, 等等。混合好。这是 10uM 系列。
- 在 C1 到 C12 中, 以下列方式稀释样品: 从 C1 取 10ul 到 D1, 从 C2 取 10ul 到 D2, 等等。混合好。这是 1uM 系列。
- 从所要的 ATP+ADP 系列转移一定量 (5ul 或 25ul) 新检测板的不同孔中, 或激酶反应所在的板上。
- 按照 III.B 描述的 ADP-Glo™ 激酶检测操作步骤, 从第 2 步开始。

4. ADP-Glo™ 激酶检测操作步骤

4.B. ADP-Glo™ 激酶检测操作步骤

当激酶反应像图 1 所示完成之后, ADP-Glo™ 激酶检测分两步进行。如果是 96 孔板, 我们建议用 25ul 激酶反应体系, 25ul ADP-Glo™ 试剂和 50ul 激酶检测试剂, 总体积为 100ul。如果是 384 孔板, 体积减 5 倍到 5ul 激酶反应, 5ul ADP-Glo™ 试剂和 10ul 激酶检测试剂。也可

以用其他体积, 只要激酶反应体积、ADP-Glo™ 试剂和激酶检测试剂体积的比例保持 1:1:2 就行。在 384 孔板上进行 ADP-Glo™ 激酶检测的操作步骤如下。

⚠ 做标准曲线和进行激酶反应时, 应使用随 ADP-Glo™ 检测提供的 Ultra Pure ATP。

- 用 1 x kinase buffer (如 1xreaction buffer A) 进行 5ul 激酶反应。

⚠ **注意:** 如果您的激酶反应温度不是室温, 在加入 ADP-Glo™ 试剂之前, 应该把平板平衡到室温。

- 加入 5ul 的 ADP-Glo™ 试剂来终止激酶反应, 同时耗尽未转化 ATP, 只留下 ADP 和极低背景的 ATP。

注意: 镁离子终浓度应小于 0.5mM。

- 在室温孵育 40 分钟。
- 加入 10ul Kinase Detection Reagent 将 ADP 转化成 ATP, 并引进萤光素酶和萤光素来检测 ATP。
- 在室温孵育 30-60 分钟, 孵育时间长短取决于在激酶反应中使用的 ATP 浓度 (见表 4)。

表 4. 转化 ADP 到 ATP 的孵育时间

ATP 浓度	10-100uM	100-500uM	500-1,000uM
时间	30 分钟	40 分钟	60 分钟

- 用能读平板的萤光发光仪 (plate reading luminometer) 或电荷耦合器件 (CCD) 相机来测量萤光。

4.C. 优化激酶反应条件

筛选激酶抑制物时，ATP 浓度用 10 μ M 或更小，便于优先鉴别出 ATP 竞争性抑制剂。要想优先鉴别 ATP 非竞争性抑制剂，就应使用较高的 ATP 浓度（高至 1mM）。

一旦 ATP 浓度改变，酶和底物浓度，反应温度和孵育时间都要相应再优化。

注意；

1. 在进行 ADP-Glo™ 激酶检测时，仅使用提供的 Ultra Pure ATP。其它来源的 ATP 可能含有 ADP 从而导致高背景值。
2. 我们建议在室温优化激酶反应条件，以保证在 ADP-Glo™ 激酶检测的过程中整个平板温度均一。

确定最佳底物浓度

1. 在整个平板上，用 1x kinase reaction buffer 进行激酶底物的 2 倍系列稀释，使用能操作的尽可能多的激酶，和将要使用的 ATP 浓度（高至 1mM）。对照是不含激酶的同样稀释系列。将平板混合好，在室温孵育一定的时间。
2. 按 4B 所述，从第 2 步开始，进行 ADP-Glo™ 激酶检测步骤。

3. 记录荧光值。

注意：最佳激酶底物浓度会使激酶反应孔和不含激酶的反应孔之间的荧光值差别最大。

确定最佳激酶量

1. 在整个平板上，用 1x kinase reaction buffer 进行 ATP 浓度（高至 1mM）和底物浓度（由前步确定）的 2 倍系列稀释。混合好平板，富于一定的时间。

⚠ 我们建议在室温优化激酶反应条件，以保证在 ADP-Glo™ 激酶检测的过程中整个平板温度均一。

2. 按 4.B 部分所述，从第 2 步开始进行 ADP-Glo™ 激酶检测操作。
3. 记录荧光强度。

4.D. 利用 ADP-Glo™ 激酶检测筛选抑制物

1. 除了 16 个对照孔外，向每个孔中加入 1 μ l 测试化合物。而在 16 个对照孔中，加入 1 μ l 测试化合物的溶剂。
2. 向 8 个测试孔中加入 2 μ l 含 2.5x 最佳浓度激酶的 1x kinase reaction buffer，但不含激酶底物。
3. 向所有剩余孔中加入 2 μ l 含有 2.5x 最佳浓度激酶和激酶底物的 1x kinase reaction buffer。
4. 向所有孔中加入 2 μ l 含有 2.5x 所要浓度的 ATP（最高 1mM）的 1x kinase reaction buffer。
5. 混合好平板，孵育一定的时间。

⚠ 我们建议在室温优化激酶反应条件，以保证在 ADP-Glo™ 激酶检测的过程中整个平板温度均一。

6. 按 4.B 部分所述，从第 2 步开始进行 ADP-Glo™ 激酶检测操作
7. 记录荧光。

注意：仪器设置参照仪器生产商说明书。每孔整合时间按 0.5-1 秒设置。



ADP-Glo™ 激酶检测

4.E. 确定激酶抑制物的 IC₅₀ 值

下面操作是为 96 孔板，用 25ul:25ul:50ul 比率设计的。如果用 384 孔板，就把体积减少 5 倍。也可以用其它体积，只要维持 kinase reaction 体积比 ADP-Glo™ 试剂体积比 Kinase Detection Reagent 体积是 1:1:2 就行。

1. 在第 2 列到第 12 列的每孔中加入 10ul 1x kinase reaction buffer.
2. 在第 1 列的孔中，加入 20ul 用 1x kinase reaction buffer 配制的最高浓度的抑制物。
3. 从第 1 列中转移 10ul 到第 2 列，混合好。继续在整个平板上进行 2 倍稀释，每次转移前都要混合好。最后 1 列的 10ul 弃去。
4. 向所有孔中加入 10ul 含有 2.5x 最佳浓度的酶。

5. 向所有孔中加入 5ul 含有 5x 最佳浓度 ATP 和 5x 最佳浓度底物的 1x kinase reaction buffer。

⚠️ 只用试剂盒提供的 Ultra Pure ATP 进行 ADP-Glo™ 激酶检测。其他来源的 ATP 可能混有 ADP, 导致高背景。

6. 混合好平板， 孵育最佳时间长度。

⚠️ 我们建议在室温优化激酶反应条件，以保证在 ADP-Glo™ 激酶检测的过程中整个平板温度均一。

7. 注意：如果激酶反应不在室温进行，则在加入 ADP-Glo™ 试剂之前将平板平衡到室温。
8. 按 4.B 部分所述，从第 2 步开始进行 ADP-Glo™ 激酶检测操作
9. 记录荧光。

注意：仪器设置参照仪器生产商说明书。每孔整合时间按 0.5-1 秒设置。