

中文说明书

ADP-Glo™ Kinase Assay

适用产品目录号：
V6930、V9101、V9102、V9103 和 V9104



ADP-Glo™ Kinase Assay

所有技术文献的英文原版均可在 www.promega.com/protocols 获得。请访问该网址以确定您使用的说明书是否为最新版本。如果您在使用该试剂盒时有任何问题，请与 Promega 北京技术服务部联系。
电子邮箱: chinatechserv@promega.com

1. 描述	2
2. 产品组分和储存条件	8
3. ADP-Glo™ Kinase Assay 准备	10
3. A. 制备 Kinase Detection Reagent	10
3. B. 建立 ATP-ADP 转化的标准曲线	11
4. ADP-Glo™ Kinase Assay 操作流程	12
4. A. Kinase Reaction Buffer 注意事项	13
4. B. ADP-Glo™ Kinase Assay 操作流程	13
4. C. 优化激酶反应条件	14
4. D. 使用 ADP-Glo™ Kinase Assay 筛选抑制剂	15
4. E. 测定激酶抑制剂 IC ₅₀ 值	16
5. 一般注意事项	17
6. 参考文献	18
7. 缓冲液和溶液组成	19
8. 相关产品	19
9. 内容变更总结	20

1. 描述

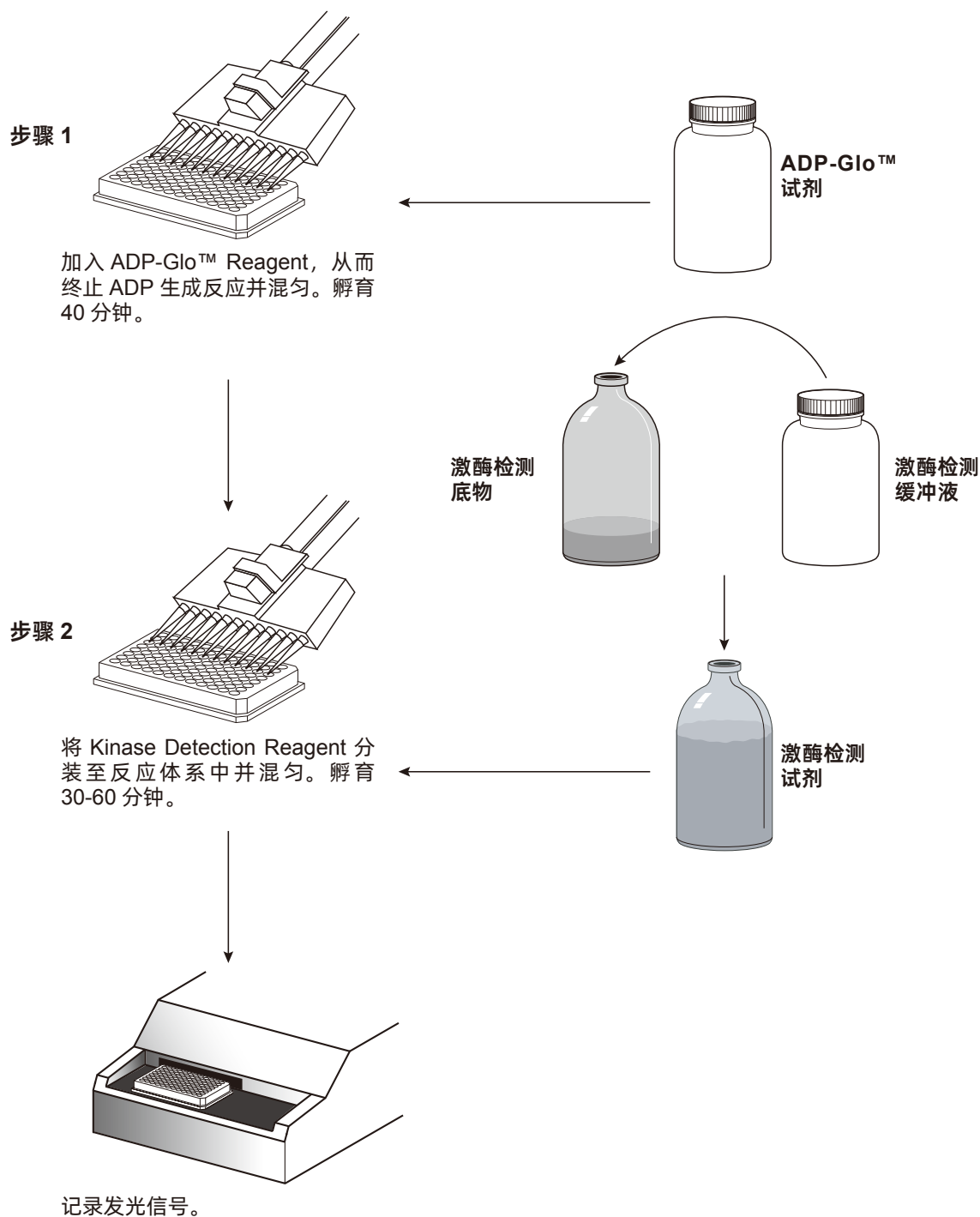
ADP-Glo™ Kinase Assay^(a-f) 是一款生物发光法的 ADP 检测试剂盒。本试剂盒提供了一种通用、均质、高通量筛选方法，可用于定量激酶反应过程中 ADP 生成量，从而检测激酶活性。ADP-Glo™ Kinase Assay 可用于监测几乎所有 ADP 生成酶（例如激酶或 ATP 酶）活性（酶反应所用 ATP 浓度可高达 1mM）。ADP-Glo™ Kinase Assay 与多孔板结合使用，反应体积低至 5μl 时也可检测激酶活性。检测过程分为 2 个步骤；首先，激酶反应后，加入与激酶反应等体积 ADP-Glo™ 试剂，从而终止激酶反应并消耗剩余 ATP。然后加入 Kinase Detection Reagent 将 ADP 转化为 ATP，并通过萤光素酶 / 萤光素反应检测新合成的 ATP（图 1 和 2）。使用发光检测仪测量产生的光信号。通过 ATP-ADP 转化曲线，从而确定发光信号与 ADP 浓度的关系（图 3）。本检测试剂盒的灵敏度较好，可检测极低浓度 ADP（20nM），且可检测含 ≤1mM ATP 反应中所生成的 ADP 量（呈线性）（图 3）。产生的发光信号与产生的 ADP 浓度成正比，且与激酶活性具有相关性（图 4）。

此外，图 4B 表明检测低 ATP 周转率的激酶时的性能较好。ADP-Glo™ Kinase Assay 几乎可与任何激酶和底物组合结合使用，无需放射性标记的组分或抗体。激酶底物可为肽、蛋白质、脂质或糖。鉴于 ADP-Glo™ Kinase Assay 的灵敏度高，因此 ADP-Glo™ Kinase Assay 几乎可用于所有激酶，尤其是低酶周转率的激酶（例如生长因子受体酪氨酸激酶）。因此，本检测试剂盒极其适用于高通量筛选，这是因为少量酶和低 ATP-ADP 转化率便可得到高信背比。（我们将 SB₅、SB₁₀ 和 SB₂₀ 分别定义为达至 5、10 和 20 信背比所需酶量。）

ADP-Glo™ Kinase Assay 依赖于一种专有的耐热萤光素酶（Ultra-Glo™ Recombinant Luciferase）的特性，试剂可产生稳定的“辉光型”发光信号，且在不同检测条件下均可改善检测性能。加入 Kinase Detection Reagent 后，便会开始萤光素酶反应，从而产生稳定时间超 3 小时的发光信号（数据未列出）。稳定性延长意味着发光检测仪无需配备注射器，且可实现多块检测板的批量处理。此外，较之于其他基于萤光素酶或基于荧光信号的检测系统，Ultra-Glo™ Recombinant Luciferase 与专有配方的 ADP-Glo™ Reagent 和 Kinase Detection Buffer 这一独特组合所产生的发光信号不易受化合物库中化合物的干扰（1,2）。除所得生化值与文献报道接近外（例如，ATP K_m 或底物 K_m）外，ADP-Glo™ Kinase Assay 还可用于区分 ATP 竞争性和非竞争性激酶抑制剂（图 5）。

ADP-Glo™ Kinase Assay 的优点

- **ATP 浓度线性范围较广（微摩尔至毫摩尔）：**区分 ATP 竞争性和非竞争性抑制剂。
- **动态范围较宽：**即便 ATP-ADP 转化率很低，信背比也很高，因此可减少酶用量。
- **灵敏度较高：**检测 0.2pmol ADP，与本底差异超 2 倍。
- **数据可靠且重现性好：**即便 ATP 消耗率较低，所得 Z' 因子值仍 >0.7。
- **通用检测系统：**可使用任何激酶和底物：底物组合，包括肽、蛋白质、脂质和糖底物。
- **正相关性：**检测信号随产物生成量的增加而呈线性增加。
- **基于生物发光法的 ADP 检测：**化合物对整体检测的干扰较少。
- **板批量处理：**发光信号稳定性极佳，3 小时后信号增加幅度 <20%。
- **均质、稳定和非放射性检测系统。**



8050MA

图 1.ADP-Glo™ Kinase Assay 操作流程的示意图。说明：400 次检测规格的 ADP-Glo™ Kinase Assay（目录号：V6930）含即用型 Kinase Detection Reagent；无需制备试剂。

1. 描述 (续)

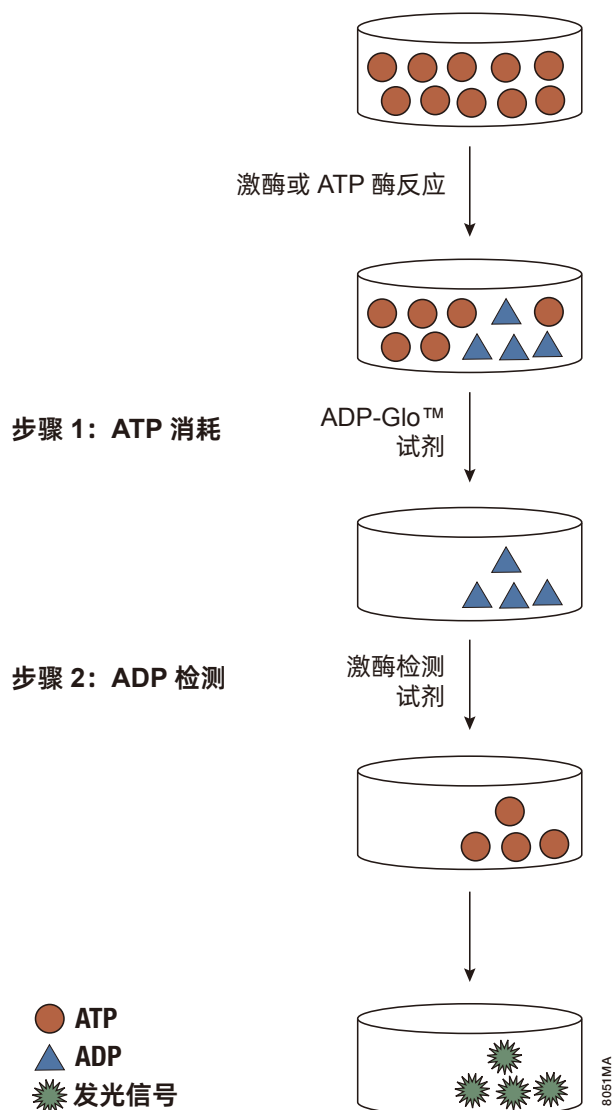
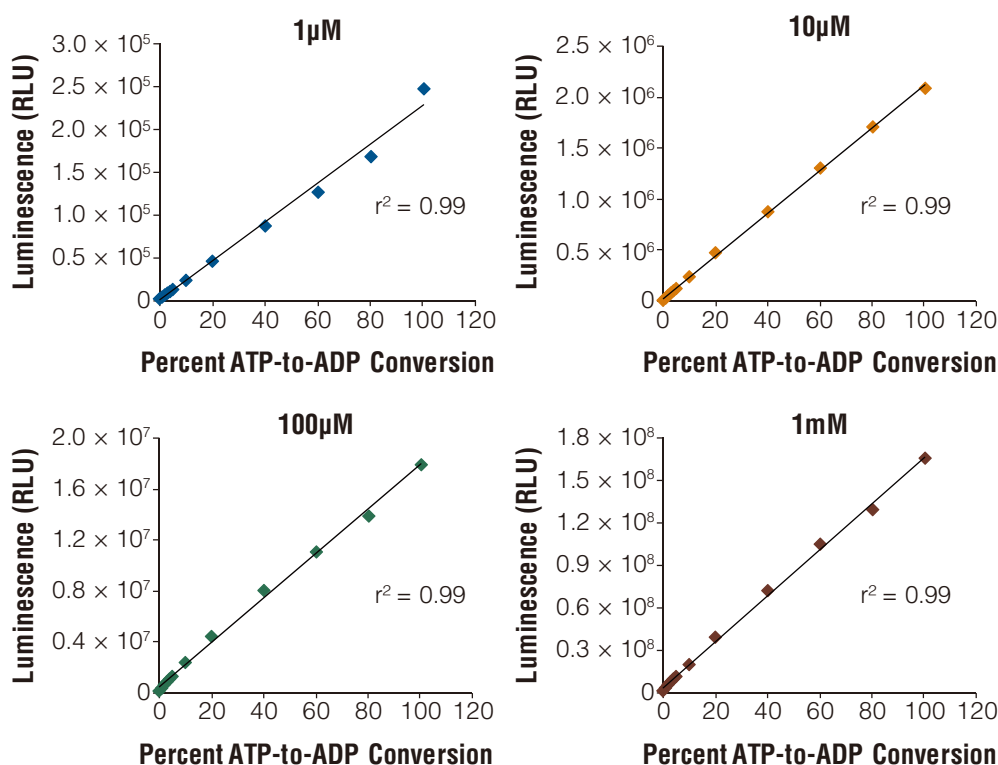


图 2. ADP-Glo™ Kinase Assay 的原理。检测过程分为 2 个步骤：1) 激酶或 ATP 酶反应后，加入 ADP-Glo™ Reagent，从而终止激酶反应并消耗剩余 ATP，2) 加入 Kinase Detection Reagent，从而将 ADP 转化为 ATP，并通过萤光素酶 / 萤光素反应检测新生成的 ATP。产生的光信号与激酶或 ATP 酶反应中产生的 ADP 量具有相关性，反映激酶或 ATP 酶的活性。

A.



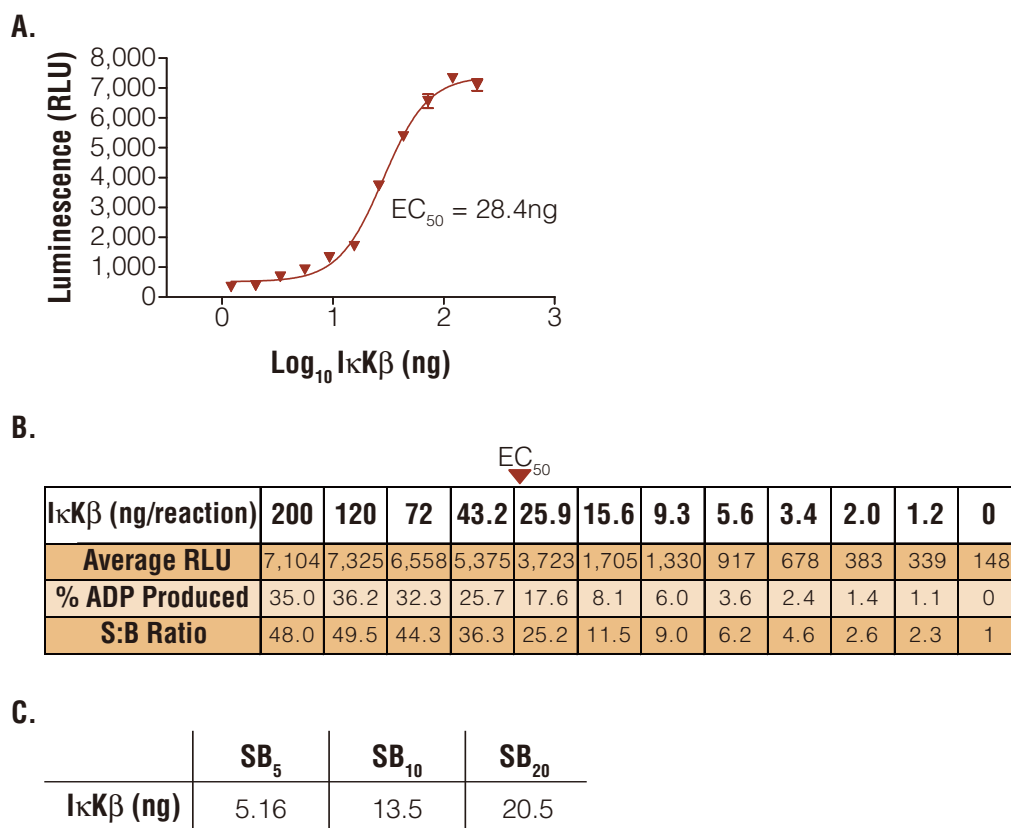
B.

Signal-to-Background Ratios

		Percent ADP in an ATP + ADP Mixture											
		100	80	60	40	20	10	5	4	3	2	1	0
[ATP + ADP]	1μM	80	54	41	28	15	8	4	4	3	2	2	1
	10μM	135	110	84	57	31	16	8	7	6	4	2	1
	100μM	125	97	77	56	31	17	9	8	6	5	3	1
	1mM	117	91	74	51	28	14	8	7	6	4	2	1

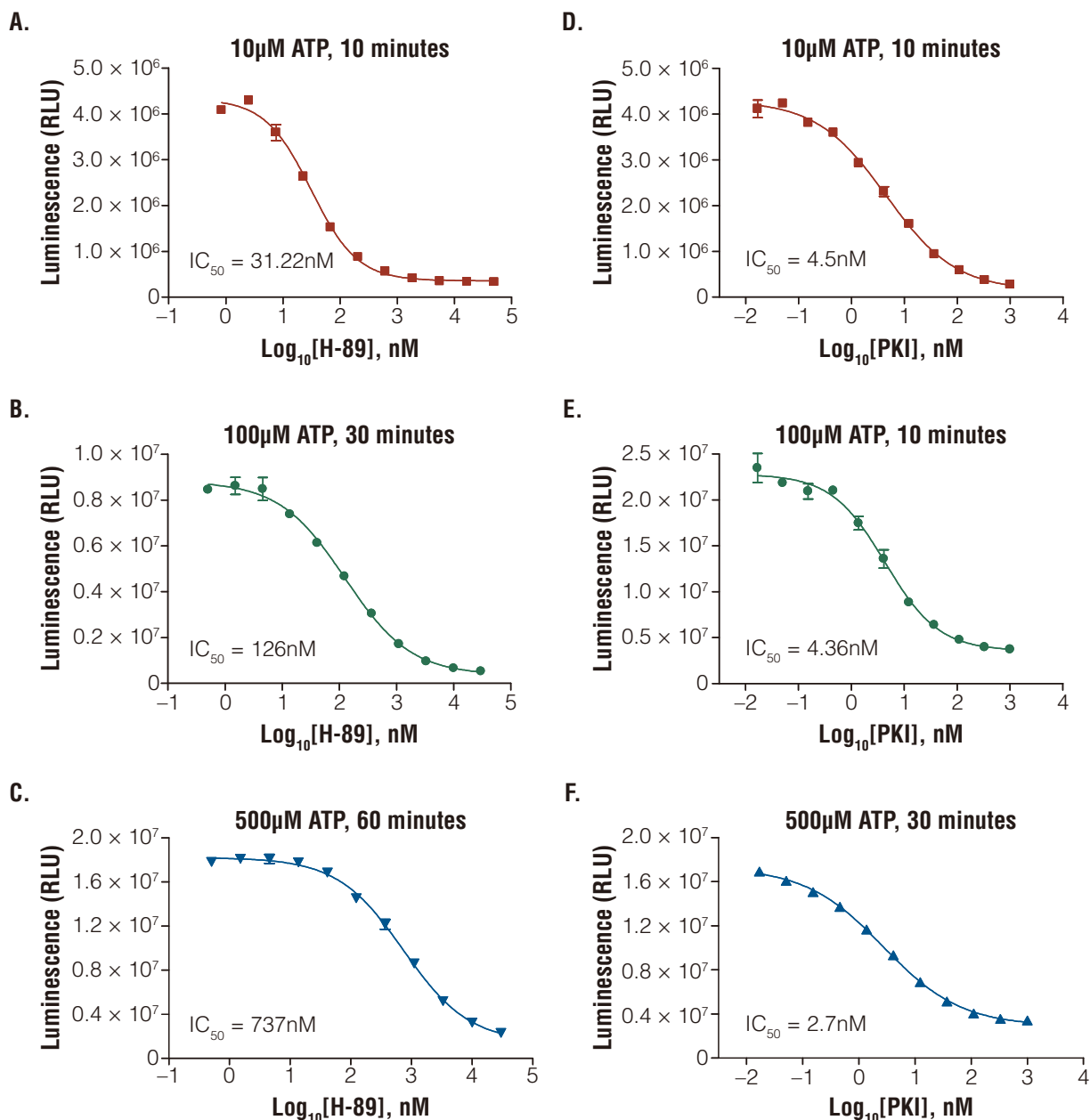
8052MA

图 3. ADP-Glo™ Kinase Assay 的灵敏度和线性。 图 A. 在白色不透明 96 孔板中，使用 1X 反应缓冲液 A（组成成分参见第 7 节）制备了 25μl 规定浓度的 ATP+ADP，从而建立了四条 ATP-ADP 转化曲线。（转化曲线制备详情参见第 3.B 节。）如第 4.B 节所述，于室温条件下使用 25μl ADP-Glo™ Reagent 和 50μl Kinase Detection Reagent 进行 ADP-Glo™ Kinase Assay 检测。使用 G1oMax® 96 微孔板读数仪（目录号：E6501）记录发光信号。图中数值为 2 个复孔的平均值。ATP+ADP 系列浓度检测结果表明，发光信号与反应缓冲液中 ADP 量之间存在线性关系。图 B. 高信背比表明，ADP-Glo™ Kinase Assay 的灵敏度较高。加入 Kinase Detection Reagent 1 小时后测量 ADP-Glo™ Kinase Assay 的发光信号。为确定信号稳定性，每隔 1 小时记录 1 次发光信号。5 小时内信号稳定，3 小时后信号增加幅度 <20%，且信背比未发生变化（数据未列出）。RLU= 相对光单位。



8053MA

图 4. 通过抑制剂 $\text{I}\kappa\text{K}\beta$ 证明 ADP-Glo™ Kinase Assay 性能。图 A. 使用 384 孔板，于室温条件下，使用 1X 反应缓冲液 A 并添加终浓度为 2mM MnCl_2 、2mM DTT 和 100 μM 钒酸钠，以 200 μM $\text{I}\kappa\text{K}\beta$ 肽 (Biomol) 作为底物，和 1 μM ATP 进行 10 μl 激酶反应 1 小时。如第 4.B 节所述，使用 10 μl ADP-Glo™ Reagent 和 20 μl Kinase Detection Reagent 检测 ADP。使用 GraphPad Prism® S 形剂量反应 (可变斜率) 软件进行曲线拟合。图 B. 同时建立 1 μM 系列 ATP-ADP 转化曲线，从而确定产生的 %ADP 与每一 RLU 值的关系。图 C. 激酶反应中可使用少量酶 (小于 EC_{50})，同时保持高信背比 (S:B 比)。数据点为复孔的平均值。 SB_5 、 SB_{10} 和 SB_{20} 的定义分别为达至 5、10 和 20 信背比所需酶量。



8054MA

图 5. 测定 ATP 竞争性和非竞争性抑制剂的 IC₅₀。使用 0.1 单位 / 孔 PKA、50 μ M 肯普肽 (PKA) 肽底物 (目录号: V5601) 和规定浓度抑制剂, 于白色平底 96 孔板中进行蛋白激酶 A (PKA) 非竞争性抑制剂 PKI 和竞争性抑制剂 H-89 滴定, 反应总体积为 50 μ l。使用 10、100 或 500 μ M ATP 进行反应, 反应时间参见各图。数据点为两次检测结果的平均值, 误差线为 $\pm$ S.D. 使用 ADP-Glo™ Kinase Assay 测得的 H-89 IC₅₀ 值随 ATP 浓度升高而升高 (图 A、B 和 C)。但是, 随着 ATP 浓度升高, PKI IC₅₀ 值仅发生细微变化 (图 D、E 和 F)。这些结果与文献报道的化合物 IC₅₀ 值有很好的 consistency [文献报道 ATP 浓度为 10 μ M 时, PKI 为 3nM (3); H-89 为 40nM (4)]。使用 GraphPad Prism® S 形剂量反应 (可变斜率) 软件进行曲线拟合。

2. 产品组分和储存条件

产品	规格	目录号
ADP-Glo™ Kinase Assay	400 assays	V6930

使用 384 孔板时，每一样品分别使用 5μl、5μl 和 10μl 激酶反应体系、ADP-Glo™ Reagent 和 Kinase Detection Reagent，本系统可进行 400 次检测。本系统也可用于 96 孔板（25μl:25μl:50μl），总共可进行 80 次检测。说明：本系统含即用型 Kinase Detection Reagent；无需制备试剂。包括：

- 2ml ADP-Glo™ Reagent
- 4ml Kinase Detection Reagent
- 0.5ml Ultra Pure ATP, 10mM
- 0.5ml ADP, 10mM

产品	规格	目录号
ADP-Glo™ Kinase Assay	1,000 assays	V9101

使用 384 孔板时，每一样品分别使用 5μl、5μl 和 10μl 激酶反应体系、ADP-Glo™ Reagent 和 Kinase Detection Reagent，本系统可进行 1,000 次检测。本系统也可用于 96 孔板（25μl:25μl:50μl），总共可进行 200 次检测。包括：

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

产品	规格	目录号
ADP-Glo™ Kinase Assay	10,000 assays	V9102

使用 384 孔板时，每一样品分别使用 5μl、5μl 和 10μl 激酶反应体系、ADP-Glo™ Reagent 和 Kinase Detection Reagent，本系统可进行 10,000 次检测。本系统也可用于 96 孔板（25μl:25μl:50μl），总共可进行 2,000 次检测。包括：

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

产品	规格	目录号
ADP-Glo™ Kinase Assay	100,000 assays	V9103

使用 384 孔板时，每一样品分别使用 5μl、5μl 和 10μl 激酶反应体系、ADP-Glo™ Reagent 和 Kinase Detection Reagent，本系统可进行 100,000 次检测。本系统也可用于 96 孔板（25μl:25μl:50μl），总共可进行 20,000 次检测。以 10×V9102 形式提供包括：

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

产品	规格	目录号
ADP-Glo™ Kinase Assay, Bulk Packaged*	100,000 assays	V9104

使用 384 孔板时，每一样品分别使用 5μl、5μl 和 10μl 激酶反应体系、ADP-Glo™ Reagent 和 Kinase Detection Reagent，本系统可进行 100,000 次检测。本系统也可用于 96 孔板（25μl:25μl:50μl），总共可进行 20,000 次检测。包括：

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

储存条件：将本系统置于 -20° C 条件下储存。使用前，先将所有组分置于室温条件下完全解冻。解冻后，应于使用前彻底混匀所有组分。制备后，应对 Kinase Detection Reagent (Kinase Detection Buffer + Substrate) 进行分装，并置于 -20° C 条件下储存。解冻时，Kinase Detection Buffer 中可能形成沉淀。沉淀物溶解相关操作流程，请参见第 3.A 节。为便于操作，ADP-Glo™ Reagent 和 Kinase Detection Reagent 可置于室温 (22° C)，24 小时内使用信号没有显著损失。

3. ADP-Glo™ Kinase Assay 准备

用户需提供的材料

- 纯白色不透光多孔板
- 多通道移液器或自动移液站
- 激酶底物
- 激酶
- 能够读取多孔板的发光检测仪
- 孔板振荡器

3.A. 制备 Kinase Detection Reagent



说明：若您使用的是 ADP-Glo™ Kinase Assay（目录号：V6930）（供 400 次检测用），则无需制备试剂，直接进行第 3.B. 节操作。如果您使用的是其他规格 ADP-Glo™ Kinase Assay（目录号：V9101、V9102、V9103 或 V9104），则应根据下述内容制备 Kinase Detection Reagent。

Kinase Detection Buffer 的制备

Kinase Detection Buffer 中可能含有沉淀物，具体取决于储存和处理条件。当缓冲液中存在沉淀物时，未观察到 ADP-Glo™ Kinase Assay 的性能发生变化。然而，为避免移液器吸头堵塞，可根据下述步骤除去或溶解沉淀物。

1. 于室温条件下解冻 Kinase Detection Buffer，并观察是否存在沉淀物。
2. 若存在沉淀物，则应将 Kinase Detection Buffer 置于 37° C 条件下孵育，并持续涡旋振荡 15 分钟，从而使沉淀物溶解。或者，从瓶中小心吸取上清液，从而除去 Kinase Detection Buffer 中沉淀物。

Kinase Detection Reagent 的制备

1. 使用前，先将 Kinase Detection Buffer 和 Kinase Detection Substrate 平衡至室温。
2. 将所有 Kinase Detection Buffer 转移至装有 Kinase Detection Substrate 的琥珀色瓶中，从而复溶底物冻干粉。复溶后所得试剂为 Kinase Detection Reagent。
3. 轻轻涡旋、旋转或上下颠倒内容物使之混匀，从而制备均匀溶液。Kinase Detection Substrate 的溶解时间应少于 1 分钟。
4. 应立即使用 Kinase Detection Reagent 或将其分装并置于 -20° C 条件下储存。实验表明，复溶后试剂经几次冻融循环后，稳定性仍较好且信号不会降低。

3.B.建立 ATP-ADP 转化的标准曲线

ADP-Glo™ Kinase Assay 可检测到 ATP-ADP 转化的细微变化。检测低活性激酶（ATP 转化率低）或使用仅产生少量 ADP 的酶时，ADP-Glo™ Kinase Assay 均可得到高信背比（图 3）。ADP-Glo™ Kinase Assay 所得 Z' 因子值较高（表 1），Z' 因子大于 0.5 时，表明检测性能极佳（5）。

表 1. 使用两个浓度系列且 ATP+ADP 混合物中不同 %ADP 所得到的 Z' 值。

ATP-ADP 转化	10μM ATP + ADP	500μM ATP + ADP
1%	0.76	0.65
5%	0.82	0.84
10%	0.90	0.86
20%	0.88	0.92

为检测激酶反应中 ADP 生成量，我们建议建立 1 条标准曲线。标准曲线代表基于激酶反应所用 ATP 浓度，将一定比例的 ATP 转化为 ADP 时所对应的发光信号（“ATP-ADP 转化曲线”）（）。这些转化曲线代表规定转化百分比时反应中可用 ATP 和 ADP 量（表 2）。取特定体积 ATP 和 ADP 储备溶液（表 3）混合，从而制备 ATP-ADP 转化曲线建立用标准样品。在本说明书中，ATP 和 ADP 总浓度以“ATP+ADP”表示。

表 2. 标准曲线表示的 ATP-ADP % 转化率。

% 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

1. 使用偏好的 1X 激酶反应缓冲液对随附 Ultra Pure ATP 和 ADP 进行稀释，从而制备 1ml 1mM ATP 和 500μl 1mM ADP。

 使用 ADP-Glo™ Kinase Assay 进行检测时，仅使用随附 Ultra Pure ATP。其他来源 ATP 可能含 ADP，从而导致高本底。

2. 取 90μl 1X 激酶反应缓冲液加至 96 孔板的 B1-B12、C1-C12 和 D1-D12 孔中。

3.B.建立 ATP-ADP 转化的标准曲线（续）

3. 如表 3 所示，取步骤 1 中制备所得 1mM ATP 和 1mM ADP 溶液置于 A1-A12 孔并混匀，从而模拟每一转化百分比对应的 ATP 和 ADP 浓度（参见表 2）。混匀。此系列为 1mM 浓度系列。

表 3. 制备 1mM 系列 ATP+ADP 标准品。

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

- 从 A1 孔中取 10μl 样品转移至 B1 孔中，从 A2 孔中取 10μl 样品转移至 B2 孔中，以此类推，从而对 A1-A12 孔中样品进行稀释。混匀。此系列为 100μM 浓度系列。
- 从 B1 孔中取 10μl 样品转移至 C1 孔中，从 B2 孔中取 10μl 样品转移至 C2 孔中，以此类推，从而对 B1-B12 孔中样品进行稀释。混匀。此系列为 10μM 浓度系列。
- 从 C1 孔中取 10μl 样品转移至 D1 孔中，从 C2 孔中取 10μl 样品转移至 D2 孔中，以此类推，从而对 C1-C12 孔中样品进行稀释。混匀。此系列为 1μM 浓度系列。
- 从所需 ATP+ADP 系列取所需量（5 或 25μl）转移至新检测板或同时存在激酶反应的检测板孔中。
- 根据第 4.B 节所述 ADP-Glo™ Kinase Assay 操作流程，从第 2 步开始操作。

说明：以上为图 3 中各系列稀释液的详细配制方法。实际使用时，依据激酶反应所用的 ATP 浓度，参照上述方法仅配制对应浓度的系列稀释液。

4. ADP-Glo™ Kinase Assay 操作流程

使用 ADP-Glo™ Kinase Assay 进行检测前，根据第 3 节所述内容，制备试剂和 ATP+ADP 标准品。计算实验所需 ADP-Glo™ Kinase Assay Reagent 体积，且使用前应取适量试剂置于室温条件下平衡。剩余未使用的 ADP-Glo™ Reagent 和 Kinase Detection Reagent 应放回 -20° C 处。激酶和激酶底物浓度优化相关信息，请参见第 4.C 节。ADP-Glo™ Reagent 和 Kinase Detection Reagent 可置于室温 (22° C)，24 小时内使用信号没有显著损失。

4.A. Kinase Reaction Buffer 注意事项

ADP-Glo™ Kinase Assay 适用于在激酶、ATP 和底物存在条件下与 1X 反应缓冲液 A（组成成分参见第 7 节）结合使用。若进行蛋白酪氨酸激酶或 lKkb 反应，我们建议向反应缓冲液 A 中加入 2mM DTT、2mM MnCl₂ 和 100μM 钒酸钠。可于 1X 反应缓冲液 A 中添加 0.5mM DTT，进行鞘氨醇激酶反应。

! 若选择其他反应缓冲液组分，则应保证 ADP-Glo™ Reagent 加入至激酶反应后，整个体系中 MgCl₂ 浓度至少为 0.5mM。

4.B. ADP-Glo™ Kinase Assay 操作流程

如图 1 所示，激酶反应结束后，分两步进行 ADP-Glo™ Kinase Assay 检测。使用 96 孔板时，我们建议使用 25μl 激酶反应体系、25μl ADP-Glo™ Reagent 和 50μl Kinase Detection Reagent，总体积为 100μl。使用 384 孔板时，体积应减少 5 倍，分别为 5μl 激酶反应体系、5μl ADP-Glo™ Reagent 和 10μl Kinase Detection Reagent。也可使用其他体积，但应保证激酶反应体积、ADP-Glo™ Reagent 体积和 Kinase Detection Reagent 比值为 1:1:2。使用 384 孔板时，ADP-Glo™ Kinase Assay 操作流程如下所述。

! 建立标准曲线和进行激酶反应时，使用 ADP-Glo™ Kinase Assay 随附的 Ultra Pure ATP。

1. 使用 1X 激酶缓冲液（例如 1X 反应缓冲液 A）进行 5μl 激酶反应。

! 若激酶反应未于室温条件下进行，则应在加入 ADP-Glo™ Reagent 前，先将板平衡至室温。

2. 加入 5μl ADP-Glo™ Reagent，从而终止激酶反应并消耗剩余 ATP，从而确保仅存在 ADP 和极低水平 ATP 本底。

! ADP-Glo™ Reagent 可有效终止激酶反应；因此，无需添加抑制剂去终止激酶反应。我们不建议修改操作流程（添加激酶终止试剂）。但是，若您确实需要修改操作流程，添加激酶终止试剂，不得使用镁螯合剂（例如 EDTA），这是因为进行 ADP-Glo™ Assay 检测时需镁离子的参与。

说明：加入 ADP-Glo™ Reagent 后，Mg²⁺ 最终浓度至少为 0.5mM。

3. 置于室温条件下孵育 40 分钟。

4. 加入 10μl Kinase Detection Reagent 将 ADP 转化为 ATP，并引入萤光素酶和萤光素检测 ATP。

4.B. ADP-Glo™ Kinase Assay 操作流程（续）

5. 于室温条件下孵育 30-60 分钟，具体取决于激酶反应所用 ATP 浓度（参见表 4）。

表 4. ADP 转化为 ATP 的孵育时间

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

6. 使用微孔板读数发光检测仪或电荷耦合器件（CCD）相机测量发光信号。

说明：仪器设置由制造商确定。每孔 0.25-1 秒的整合时间作为参考时间。若有需要，读板前可将检测板置于室温条件下放置较长时间，这是因为 ADP-Glo™ Kinase Assay 的信号半衰期较长。

4.C. 优化激酶反应条件

为保证 ADP-Glo™ Kinase Assay 的检测性能，应对激酶反应中激酶和激酶底物用量进行优化。若已确定激酶或激酶底物用量，则按第 4.B 节所述内容进行操作。

筛选激酶抑制剂时，使用 10μM 或更低浓度 ATP 确定 ATP 竞争性抑制剂。确定 ATP 非竞争性抑制剂，则应使用更高浓度 ATP（最高为 1mM）。若 ATP 浓度发生变化，则应对酶和底物浓度、反应温度和孵育时间进行优化。

说明：

1. 使用 ADP-Glo™ Kinase Assay 进行检测时，仅使用随附 Ultra Pure ATP。其他来源 ATP 可能含 ADP，从而导致高本底。
2. 我们建议于室温条件下优化激酶反应条件，从而确保 ADP-Glo™ Kinase Assay 检测期间孔板温度均匀。

确定最佳底物浓度

1. 使用 1X 激酶反应缓冲液于板中对激酶底物进行 2 倍系列稀释，同时激酶用量为实际所需用量和所需 ATP 浓度（最高 1mM）。于不添加激酶的条件下进行同样一组滴定（作为对照组）。混匀加入所有激酶反应成分的检测板，并孵育所需时间。
2. 根据第 4.B 节所述 ADP-Glo™ Kinase Assay 操作流程，从第 2 步开始操作。
3. 记录发光信号。

说明：激酶底物浓度为最佳时，激酶反应孔和不含激酶孔之间发光信号差异最大。

确定最佳激酶量

1. 使用 1X 激酶反应缓冲液于板中对激酶进行 2 倍系列稀释，同时使用所需量 ATP（最大为 1mM）和激酶底物（上一环节确定用量）。混匀加入所有激酶反应成分的检测板，并孵育所需时间。



我们建议于室温条件下优化激酶反应条件，从而确保 ADP-Glo™ Assay 检测期间孔板温度均匀。

2. 根据第 4.B 节所述 ADP-Glo™ Kinase Assay 操作流程，从第 2 步开始操作。
3. 记录发光信号。

说明：后续化合物筛选和 IC₅₀ 测定过程中所用最佳激酶用量所产生的发光信号应落在激酶滴定曲线线性范围内且信背比适宜。

鉴于 ADP-Glo™ Kinase Assay 灵敏度极高，因此本试剂盒可检测极低水平 ADP 且信背比较高。鉴于 ADP-Glo™ Kinase Assay 所得信背比较高，因此仅使用少量的酶产生较低的 ATP-ADP 转化率就足以进行检测。图 4 表明，使用少量酶生成的 ADP 量所得信背比（SB）为 5、10 或 20（分别为 SB₅、SB₁₀ 和 SB₂₀）。

4.D. 使用 ADP-Glo™ Kinase Assay 筛选抑制剂

下述操作流程仅为示例；可根据实际情况调整实际使用体积。ADP-Glo™ Reagent 体积应等于激酶反应体积，Kinase Detection Reagent 体积应为激酶反应体积的 2 倍。本文所述体积适用于 384 孔板（5μl:5μl:10μl 比例）；若使用 96 孔板进行检测，则体积应增加到 5 倍。

1. 取 1μl 测试化合物加入每一孔中，但 16 个对照孔中应加入 1μl 测试化合物溶媒。
2. 取 2μl 溶于 1X 激酶反应缓冲液的 2.5X 最佳浓度激酶（不含激酶底物），加入 8 个对照孔中。
3. 取 2μl 溶于 1X 激酶反应缓冲液的 2.5X 最佳浓度激酶和激酶底物，加入剩余孔中。
4. 取 2μl 溶于 1X 激酶反应缓冲液的 2.5X 所需浓度 ATP（最高为 1mM），加入所有孔中。

4.D. 使用 ADP-Glo™ Kinase Assay 筛选抑制剂 (续)

5. 混合板, 并孵育所需时间。

! 我们建议于室温条件下优化激酶反应条件, 从而确保 ADP-Glo™ Assay 检测期间孔板温度均匀。

6. 根据第 4.B 节所述 ADP-Glo™ Kinase Assay 操作流程, 从第 2 步开始操作。

7. 记录发光信号。

说明: 仪器设置由制造商确定。每孔 0.25-1 秒的整合时间作为参考时间。

4.E. 测定激酶抑制剂 IC₅₀ 值

以下方案是为 96 孔板设计的, 使用 25μl:25μl:50μl 的比例。如于 384 孔板中进行检测, 体积须减少到五分之一。也可使用其他体积, 但应保证激酶反应体积、ADP-Glo™ Reagent 体积和 Kinase Detection Reagent 体积比值为 1:1:2。

1. 取 10μl 1X 激酶反应缓冲液加至第 2 列至第 12 列的每一孔中。

2. 取 20μl 抑制剂 (使用 1X 激酶反应缓冲液稀释至所需最高浓度) 加至第 1 列的孔中。

3. 从第 1 列孔中取 10μl 转移至第 2 列。混匀。重复该操作, 继续在孔板上进行 2 倍系列稀释, 每次稀释前先应混匀。弃去最后一列所取的 10μl。

4. 取 10μl 溶于 1X 激酶反应缓冲液的 2.5X 最佳浓度酶, 加入所有孔中。

5. 取 5μl 溶于 1X 激酶反应缓冲液的 5X 最佳浓度 ATP 和 5X 最佳浓度底物, 加至所有孔中。

! 使用 ADP-Glo™ Kinase Assay 进行检测时, 仅使用随附 Ultra Pure ATP。其他来源 ATP 可能含 ADP, 从而导致高本底。

6. 混合板, 并孵育所需时间。

! 我们建议优化激酶反应条件, 使反应可以在室温下进行, 以避免形成温度梯度。

说明: 若激酶反应未于室温条件下进行, 则应在加入 ADP-Glo™ Reagent 前, 先将板平衡至室温。

7. 根据第 4.B 节所述 ADP-Glo™ Kinase Assay 操作流程, 从第 2 步开始操作。

8. 记录发光信号。

说明: 仪器设置由制造商确定。每孔 0.25-1 秒的整合时间作为参考时间。

5. 一般注意事项

温度：ADP-Glo™ Kinase Assay 所得发光信号强度和稳定性取决于萤光素酶反应速率。影响萤光素酶反应速率的环境因素可导致光输出信号强度和发光信号稳定性发生变化。温度是影响酶促检测速率的一项因素，因此光输出信号也会受影响。为得到一致结果，加入 ADP-Glo™ Kinase Assay 试剂前，先将检测板和试剂平衡至室温。平衡不充分可能导致孔板中心和边缘孔间存在温度梯度，从而导致板不同孔间存在差异。

溶剂和其他化学品：ADP-Glo™ Kinase Assay 的第 1 步或第 2 步检测反应所处的化学环境可对酶促速率造成影响，从而影响发光信号强度。我们建议激酶缓冲液 pH 值应为 7-8。不同测试化合物重悬所用的溶媒或激酶反应缓冲液所用试剂可能对萤光素酶反应造成干扰，从而影响检测系统的光输出信号。结果表明，ADP-Glo™ Kinase Assay 可兼容或耐受多种化学品（表 5）。可通过设置一组平行对照孔（不含激酶或激酶底物）并使用 ADP 作为底物，从而检测对萤光素酶反应的干扰。

表 5. 与 ADP-Glo™ Kinase Assay 兼容的溶剂和化学品。

化学品	最大耐受浓度
NaCl	200mM
CaCl ₂	2.5mM
Calmodulin	5μM
DTT	10mM
MgCl ₂	50mM
MnCl ₂	5mM
DMSO	5%
Sodium orthovanadate	500μM
Tergitol-NP-9	0.1%
Tween®-20	0.2%
Triton® X-100	0.2%

孔板建议：我们建议使用适用于发光信号检测的标准纯白色多孔板。若需了解最适用于您所用仪器的孔板，请与发光检测仪制造商取得联系。

5. 一般注意事项 (续)

ADP-Glo™ Kinase Assay 干扰化合物的检测: 仅抑制激酶的测试化合物与溶媒对照相比, 可导致发光信号降低, 且可轻易与抑制检测系统其他组分的化合物区分。抑制检测系统的其他组分的测试化合物 (单独或结合激酶) 可能导致发光信号升高、降低或对发光信号无影响, 具体取决于其对激酶、萤光素酶或其他酶成分的抑制水平。为确认激酶筛选命中情况是否由于对 ATP 酶促消耗或发光信号产生造成化学干扰, 应设置无激酶但存在其他所有检测组分的模拟反应, 包括 ADP 和 ATP 混合物从而模拟激酶反应结果。加入适当浓度的测试化合物 (一般为 10 μ M) 或溶媒对照 (例如, 1%DMSO), 从而模拟不存在激酶但 ADP 和 ATP 终浓度为 2 μ M 和 8 μ M 的反应 (参见第 3.B 节建立 ATP-ADP 转化的标准曲线)。与溶媒对照反应 (未加入测试化合物) 相比, 影响检测性能的测试化合物可导致发光信号变化幅度超 20%。30 种 ATP 竞争性抑制剂 (不同化学类别) 检测结果表明, 这些化合物均不会对 ADP-Glo™ Kinase Assay 造成干扰 (6)。抑制萤光素酶的测试化合物可能会导致错误命中。但是, Ultra-Glo™ Recombinant Luciferase 和 ADP-Glo™ Kinase Assay 专有缓冲液成分的独特组合可显著减少错误命中数量 (1,7)。

6. 参考文献

1. Auld, D.S. *et al.* (2009) A basis for reduced chemical library inhibition of firefly luciferase obtained from directed evolution. *J. Med. Chem.* **52**, 1450-8.
2. Jia, Y. *et al.* (2008) Current in vitro kinase assay technologies: The quest for a universal format. *Curr. Drug. Discov. Technol.* **5**, 59-69.
3. Walsh, D.A. and Glass, D.B. (1991) Utilization of the inhibitor protein of adenosine cyclic monophosphate-dependent protein kinase, and peptides derived from it, as tools to study adenosine cyclic monophosphate-mediated cellular processes. *Methods Enzymol.* **201**, 304-16.
4. Hidaka, H., Watanabe, M. and Kobayashi, K. (1991) Properties and use of H series compounds as protein kinase inhibitors. *Methods Enzymol.* **201**, 328-39.
5. Zhang, J.H. *et al.* (1999) A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Screen.* **4**, 67-73.
6. Alli, C. *et al.* Nerviano Medical Sciences. ADP-Glo: The new luminescent ADP detection assay as a universal, quantitative and robust alternative for kinase profiling. Poster #P3016. *Society for Biomolecular Sciences*, April 2009.
7. Auld, D.S. (2009) Promega's bioluminescent assays: Comparison of kinase assays using product depletion and product formation. *GTC Bio 4th Annual Protein Kinases in Drug Discovery Conference, Boston, MA, May 4-5, 2009.*

7. 缓冲液和溶液组成

1X Kinase Reaction Buffer A

40mM	Tris (pH 7.5)
20mM	MgCl ₂
0.1mg/ml	BSA

8. 相关产品

Protein Kinase Assay System

产品	规格 *	目录号
ADP-Glo™ Max Assay	1,000 assays	V7001
Kinase-Glo® Luminescent Kinase Assay	10ml	V6711
Kinase-Glo® Plus Luminescent Kinase Assay	10ml	V3771
Kinase-Glo® Max Luminescent Kinase Assay	10ml	V6071
ProFluor® PKA Assay	4 plate	V1240
ProFluor® Src-Family Kinase Assay	4 plate	V1270
PepTag® Non-Radioactive PKC Assay	120 reactions	V5330
PepTag® Non-Radioactive cAMP-Dependent Protein Kinase Assay	120 reactions	V5340

* 还可提供其他规格产品。

SignaTECT® Protein Kinase Assay System

产品	规格	目录号
SignaTECT® cAMP-Dependent Protein Kinase (PKA) Assay System	96 reactions	V7480
SignaTECT® Protein Kinase C (PKC) Assay System	96 reactions	V7470
SignaTECT® Protein Tyrosine Kinase (PTK) Assay System	96 reactions	V6480
SignaTECT® Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase (CaM KII) Assay System	96 reactions	V8161
SignaTECT® DNA-Dependent Protein Kinase Assay System	96 reactions	V7870
SignaTECT® cdc2 Protein Kinase Assay System	96 reactions	V6430

8. 相关产品（续）

SAM^{2®} Biotin Capture Membran

产品	规格	目录号
SAM ^{2®} Biotin Capture Membrane	96 samples	V2861
	7.6 x 10.9cm	V7861

Purified Kinase

产品	规格	目录号
cAMP-Dependent Protein Kinase, Catalytic Subunit	2,500u	V5161
Protein Kinase C	1µg	V5261
EGF Receptor	10u	V5551
DNA-Dependent Protein Kinase	2,500u	V5811
Casein Kinase I	100u	V5631
Casein Kinase II	100u	V5621

可从 Promega 公司处购买超 170 种激酶系统（KES）。所有系统均已优化，可与 ADP-Glo™ Kinase Assay 结合使用。每一 KES 均包含检测所需酶、底物、反应缓冲液和添加组分。若需获取更多信息，请访问 www.promega.com/kinase。

9. 内容变更总结

本文件的 3/15 修订版对以下内容进行了变更：

1. 文件更新，删除过期免责声明。

^(a) U.S. Pat. No. 8,183,007 and other patents pending.

^(b) U.S. Pat. Nos. 6,602,677, 7,241,584 and 8,030,017, European Pat. No. 1131441, Japanese Pat. Nos. 4537573 and 4520084 and other patents pending.

^(c) U.S. Pat. Nos. 7,083,911, 7,452,663 and 7,732,128, European Pat. No. 1383914 and Japanese Pat. Nos. 4125600 and 4275715.

^(d) U.S. Pat. No. 7,700,310, European Pat. No. 1546374 and other patents pending.

^(e) U.S. Pat. No. 7,741,067, Japanese Pat. No. 4485470 and other patents pending.

^(f) Licensed from Lonza Nottingham Ltd. under U.S. Pat. Nos. 6,599,711 and 6,911,319 and other pending and issued patents.

© 2009, 2012, 2014, 2015 Promega Corporation. All Rights Reserved.

GloMax, Helix, Kinase-Glo, PepTag, ProFluor, SAM2 and SignaTECT are registered trademarks of Promega Corporation. ADP-Glo, Ultra-Glo is a trademark of Promega Corporation.

GraphPad Prism is a registered trademark of GraphPad Software, Inc. Tween is a registered trademark of ICI Americas, Inc. Triton is a registered trademark of Union Carbide Chemicals & Plastics Technology Corporation.

Products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations. Please visit our Web site for more information.

All prices and specifications are subject to change without prior notice.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.