

中文说明书

丝氨酸 / 苏氨酸磷酸酶 检测系统

适用产品目录号：
V2460



丝氨酸 / 苏氨酸磷酸酶检测系统

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. 产品描述.....	1
2. 产品组分和储存条件.....	4
3. 实验开始前.....	4
3.A 选择检测形式.....	4
3.B 底物.....	5
3.C 缓冲液.....	6
3.D 测试反应中的组分.....	6
4. 检测方案.....	7
4.A 制备染料.....	7
4.B 制备组织提取物或细胞裂解物.....	7
4.C 磷酸酶检测操作方案.....	9
5. 缓冲液和溶液组分.....	12
6. 相关产品.....	13
7. 参考文献.....	14

1. 产品描述

非放射性丝氨酸 / 苏氨酸磷酸酶检测系统 (Serine/Threonine Phosphatase Assay System) 为测定蛋白质丝氨酸 / 苏氨酸磷酸酶活性提供了一种快速、方便、灵活的方法。该系统通过测量钼酸盐：孔雀石绿：磷酸盐复合物 (molybdate: malachite green: phosphate complex) 的吸光度来确定磷酸酶反应中产生的游离磷酸盐的量 (1-3)。该系统允许使用各种缓冲液条件和底物 (包括天然磷酸化蛋白或合成磷酸肽)。

蛋白质磷酸化在调节许多不同的细胞过程中发挥着重要作用，包括分化、细胞分裂、新陈代谢、收缩性、受精和记忆 (相关综述见参考文献 4-17)。这些反应受蛋白激酶和蛋白磷酸酶之间微妙平衡的调节。通过测量放射性磷酸盐与蛋白质或特定肽底物的结合情况可以相对容易地研究蛋白激酶，但研究蛋白磷酸酶的特征则比较困难。一种方法是使用放射性标记的磷酸酶底物。然而，这种方法有几个缺点：用放射性磷酸盐预先标记蛋白质底物耗费时间，必须反复制造标记的底物，而且得到的底物很少能以最佳浓度使用。

1. 产品描述 (接上页)

蛋白磷酸酶可分为两大类：1) 从含有磷酸酪氨酸的蛋白质或肽中去除磷酸盐的磷酸酶；2) 从含有磷酸丝氨酸或磷酸苏氨酸的蛋白质或肽中去除磷酸盐的磷酸酶。为了区分这两类磷酸酶，我们设计了两种检测系统。

酪氨酸磷酸酶检测系统 (Cat.# V2471; 已停产) 含有两种化学合成的磷酸肽：END(pY)INASL (18) 和 DADE(pY) LIPQQG (19)，它们是一些蛋白酪氨酸磷酸酶的底物。丝氨酸 / 苏氨酸磷酸酶检测系统 (Cat.# V2460) 含有化学合成的磷酸肽 RRA(pT)VA，这种多肽底物与多种丝氨酸 / 苏氨酸磷酸酶兼容，如蛋白磷酸酶 2A、2B 和 2C (20)。然而，该系统所提供的磷酸肽对于蛋白磷酸酶 1 (PP1) 而言是一种较差的底物，因为蛋白磷酸酶 1 对底物结构的要求更为严格。

丝氨酸 / 苏氨酸磷酸酶检测系统的线性范围为 0-4,000pmol 磷酸盐标准品，检测灵敏度为 ≥ 500 pmol 磷酸盐标准品。虽然该系统的检测范围下限灵敏度低于放射性检测，但是它的底物浓度和工作线性范围与常用的使用磷酸肽底物的磷酸酶的 V_{max} 和 K_m 值相符。这一特点能更准确地评估动力学数据，而所谓的更灵敏的方法却无法做到这一点。在更高一些的线性范围内工作还能降低检测到异常磷酸酶活性（源自某些磷酸酶具有杂泛性）的可能性。在这一灵敏度范围内，低纳克级水平的磷酸酶也可以进行检测。

除了测量部分分馏和纯化样品中的磷酸酶活性外，丝氨酸 / 苏氨酸磷酸酶检测系统还能测量细胞或组织的粗提取物中的磷酸酶活性。对于这种应用，在进行检测之前，可使用试剂盒中随附的离心柱 (Spin Columns) 去除这些制备物（指细胞或组织的粗提取物）中的高浓度磷酸盐。（离心柱能快速有效地去除样品中的游离磷酸盐和其他低分子量抑制剂。）此外，该系统中独特的钼酸盐染料添加剂 (Molybdate Dye Additive) 与钼酸盐染料溶液 (Molybdate Dye Solution) 混合使用还有助于溶解暴露在钼酸盐染料溶液酸性条件下的蛋白质（单独使用钼酸盐染料溶液可能会导致蛋白质沉淀）。

图 1 概述了使用该系统测量部分纯化的酶制剂或细胞 / 组织提取物中的丝氨酸 / 苏氨酸磷酸酶活性所需的步骤。

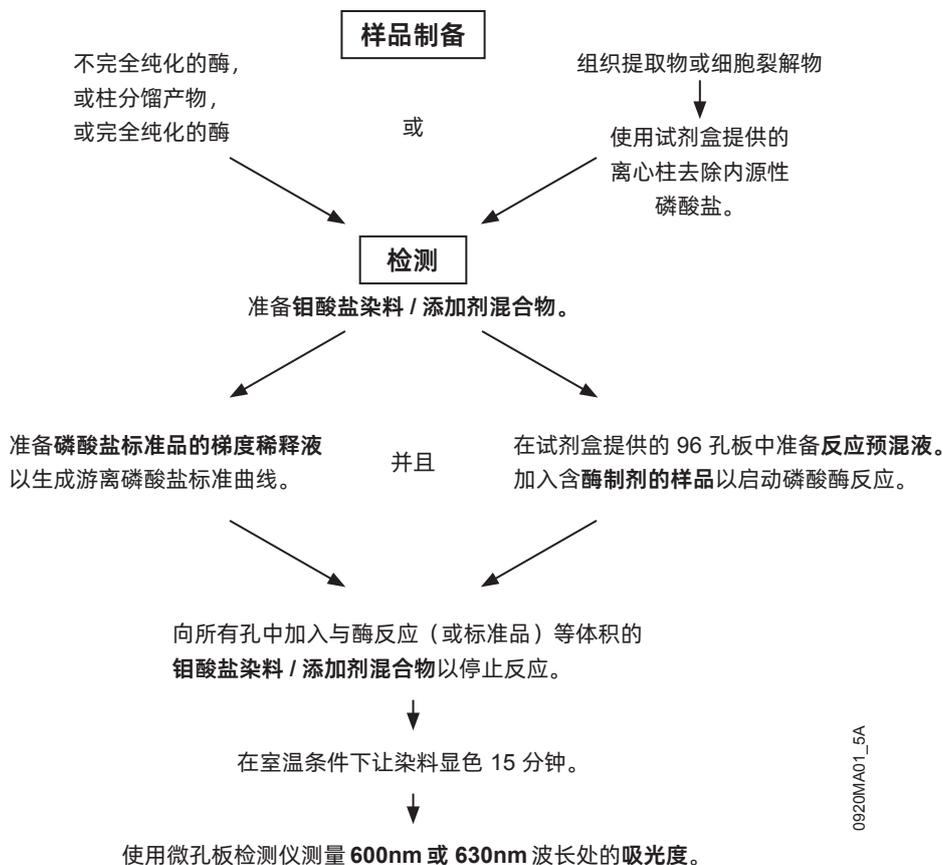


图 1. 使用丝氨酸 / 苏氨酸磷酸酶检测系统测量丝氨酸 / 苏氨酸磷酸酶活性所需步骤概览。该系统可用于测量部分纯化的酶制剂和组织提取物 / 细胞裂解物中的磷酸酶活性。

2. 样品组分和储存条件

产品	规格	目录号
Serine/Threonine Phosphatase Assay System	96 reactions	V2460

每个系统包含足够进行 96 次磷酸酶反应并检测的试剂。包括：

- 20ml Molybdate Dye Solution (钼酸盐染料溶液)
- 200 μ l Molybdate Dye Additive (钼酸盐染料添加剂)
- 1ml Phosphate Standard, 1mM (磷酸盐标准品)
- 1mg Ser/Thr Phosphopeptide (Ser/Thr 磷酸肽)
- 1 96-Well Plate ($\frac{1}{2}$ -area, flat-bottom) (96 孔半区微孔板)
- 4 Spin Columns, Reservoirs and Adaptors (离心柱、储液管与适配器组合)
- 40ml Sephadex[®] G-25 (Sephadex[®] G-25 葡聚糖凝胶过滤介质)
- 25ml Phosphate-Free Water (无磷酸盐水; 无磷水)

储存条件: 将整个系统保存在 4°C。96 孔板和离心柱组合可在室温下保存。重组的 Ser/Thr 磷酸肽 (第 3.B 节方法制备) 可在 4°C 或 -20°C 下保存。

3. 实验开始前

3.A 选择检测形式

磷酸酶检测可在试剂盒提供的 96 孔半区微孔板 (Costar[®] Cat.# 3690) 或其他光学质量好的标准 96 孔板中进行。相较于标准 96 孔板, 本系统提供的 96 孔板的孔径和容积 (190 μ l) 均有所减小, 可容纳标准的 50 μ l 反应液 (或标准品) 加 50 μ l 钼酸盐染料 / 添加剂混合物的检测体系。系统提供的 96 孔半区微孔板由于其孔形状高而窄, 比标准 96 孔板的吸光度读数更高。所提供平板的 96 孔形式可以非常方便地在多种条件下使用多个时间点进行样品分析。



请在所有孔都用完之后, 再丢弃提供的平板。请勿重复使用已进行过染色反应的孔。

如果您选择使用标准 96 孔板形式进行检测, 则以 50-100 μ l 体积进行磷酸酶反应, 并按照第 4.A 节所述加入与您选定的反应等体积的钼酸盐染料 / 添加剂混合物。

在任何给定的磷酸盐浓度 (和样品体积) 下, 标准板的光学密度通常只有所提供的 96 孔板的一半左右, 因此阴性对照样品的本底会相应更低。由于标准板的灵敏度较低, 因此可以准确测量较高浓度的磷酸盐 (在微孔板读数仪的光学元件产生非线性反应之前, 最多可检测 4nmol 磷酸盐)。两类平板的比较见图 2。

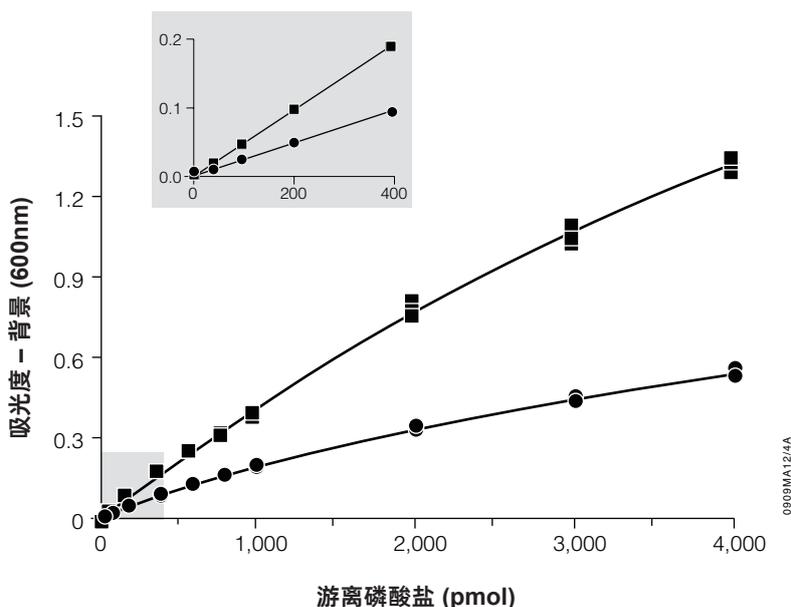


图 2. 使用提供的 96 孔半区板 (方块) 和标准 96 孔板 (圆点) 测量磷酸盐标准品吸光度结果的比较。样品一式三份。插入图显示了相同实验中较低的线性检测范围区间的结果。

如果没有微孔板读数仪, 那么需要使用较大的检测体系 (如 400 μ l 反应混合物加上 400 μ l 钼酸盐染料 / 添加剂混合物), 以便使用比色皿和分光光度计进行吸光度读取。请自行确定一次性比色皿 (染料会对比色皿染色, 建议使用一次性比色皿) 中可使用的最小检测容量。其中一半体积必须是钼酸盐染料 / 添加剂混合物 (在第 4.A 节中制备); 另一半可以是反应混合物或反应混合物与水的混合物。如果使用最终体积 (反应混合物加钼酸盐染料 / 添加剂混合物) 为 800 μ l 的检测体系, 系统中的钼酸盐染料溶液足够进行约 50 次检测反应。

3.B 底物

磷酸肽

用 1.33ml 提供的无磷水将提供的 Ser/Thr 磷酸肽重新溶解, 构成 1mM 的底物溶液。对一般用途来说, 在 50 μ l 反应中加入 5 μ l 重构底物即可, 这样可产生 100 μ M 磷酸肽, 从而在反应过程中释放出最多可达 5nmol 磷酸盐。如需获得动力学数据, 可根据所研究酶的 K_m 值, 在 10-400 μ M 范围内滴定反应中的底物量, 进行底物浓度分析。

3.B 底物 (接上页)

表 1. 所提供的 Ser/Thr 磷酸肽的物理特性。

磷酸肽	序列	分子量	制成 1mM 溶液所需水的体积
Ser/Thr Phosphopeptide	RRA(pT)VA	754Da	1.33ml

磷酸蛋白

其他底物，比如组蛋白、酪蛋白或相关磷酸酶的天然底物也可用于该检测。这些蛋白质中有些可以通过商业途径以部分去磷酸化状态获得，但在使用前通常需要进行大量透析以去除游离磷酸盐。此外，大分子量蛋白质、有多个磷酸化位点的蛋白质或在强酸中溶解度有限的蛋白质需要先进行第 3.D 节所述的初步测试。

3.C 缓冲液

磷酸酶是一个大家族，众多磷酸酶的最佳反应条件是多种多样的；因此一个通用的缓冲液系统是无法被提供的。第 5 节中列出了部分磷酸酶类型的建议缓冲液。

3.D 测试反应中的组分

由于该系统测定的直接指标是游离磷酸盐，因此任何含磷酸盐的缓冲液（如 PBS）均与本系统不兼容。含有磷酸盐的反应成分（如磷酸甘油）可能会干扰分析，具体取决于其浓度、纯度和在强酸中的稳定性。高浓度的还原剂可能会随着时间的推移而漂白染料的颜色，导致灵敏度降低。最终浓度为 0.02% 的 β -巯基乙醇对灵敏度没有影响；0.05% 的 β -巯基乙醇仅有轻微影响；0.1% 的 β -巯基乙醇会使灵敏度降低约 20%（最终浓度指在磷酸酶反应中的最终浓度）。许多去污剂（例如 Triton[®] X-100）可在浓度小于等于 0.1%（指在磷酸酶反应中的最终浓度）的条件下使用，但更高的浓度可能会产生较高的背景。如果磷酸酶反应中需要高浓度的去污剂，可通过同时在磷酸盐标准品中加入相应浓度的去污剂来测定背景值（详细说明见第 4.B 节步骤 1 后的注意事项）。此外，某些蛋白质（如酪蛋白）不溶于强酸，加入钼酸盐染料 / 添加剂混合物后会沉淀，因此需要额外处理步骤（见本节注意事项）。

为测试各种组分的适用性，可在总共 50 μ l 的溶液中以最高使用浓度加入单个或组合组分。向其中加入 50 μ l 的钼酸盐染料 / 添加剂混合物（在第 4.A 节中制备），混匀后室温下孵育 15 分钟（如果含有 5 μ g 以上的蛋白质，则孵育 30 分钟）。同时制备一份对照反应，其中应含有 50 μ l 提供的无磷水并加入 50 μ l 钼酸盐染料 / 添加剂混合物。若测试组分保持黄色（与对照组一致）且不会导致沉淀，则该组分与本系统兼容。可通过测定 600-630nm 波长下的光密度（吸光度）来确定准确的测试组分产生的背景值。本底对照产生的背景值（平板加水 / 染料混合物）通常在 0.06 至 0.13 之间，具体值取决于所使用的平板类型和检测波长。

注意：如果加入钼酸盐染料 / 添加剂混合物后出现蛋白质沉淀，可使用更低浓度的蛋白质进行反应，或在反应完成后，先用 10 μ g 蛋白酶 K 在含有 5mM CaCl₂（蛋白酶消化反应中的最终浓度）的缓冲液中于 30 $^{\circ}$ C 下处理反应 5 分钟，然后再加入钼酸盐染料 / 添加剂混合物（钼酸盐染料 / 添加剂体积应等于磷酸酶反应加上蛋白酶 K 与对应缓冲液的总体积）。第 4 节中描述的标准方案可在存在 >200 μ g BSA（或 75 μ g 乙酰化 BSA）或约 50 μ g 组织提取物蛋白质的情况下进行精确测量，且无需在反应后进行蛋白酶消化。

! **重要：**如果出现蛋白质沉淀，要么使用较低浓度的蛋白质，要么在反应完成后用蛋白酶 K 处理反应。

4. 检测方案

以下方案可用于定量检测细胞裂解物、组织提取物、部分分馏样品或纯化酶中的蛋白质丝氨酸 / 苏氨酸磷酸酶活性。对于部分纯化的样品（如细胞裂解物、组织提取物、部分分馏样品），需要确保其中的游离磷酸盐浓度低于 5 μ M（前提是每 50 μ l 反应中样品添加量为 5 μ l；若需添加更多样品，则应确保游离磷酸盐浓度更低），除此之外无其他特殊的样品制备步骤要求。

本磷酸酶测定方法可使用多种缓冲液、还原剂、去污剂和甘油。不过，为确保这些成分的兼容性，请按照第 3.D 节所述对所有上述试剂进行预试验。

4.A 制备染料

根据您的选择的特定的检测形式和样品数量来确定全部反应的体积。在提供的 96 孔板或其他标准板中制备的反应，每个 50 μ l 反应需要 50 μ l 钼酸盐染料 / 添加剂混合物。（可使用更大的反应体积。）如果使用分光光度计测量结果，大约需要每 400 μ l 反应添加 400 μ l 钼酸盐染料 / 添加剂混合物。在实验的当天配制钼酸盐染料 / 添加剂混合物。制备方法为：每 1mL 钼酸盐染料溶液中加入 10 μ l 钼酸盐染料添加剂并混匀。

不要打算将已经混合好的试剂（钼酸盐染料 / 添加剂混合物）留待将来使用。钼酸盐染料 / 添加剂混合物相对不稳定；应只准备一天之内所需的量即可。

注意：若使用部分纯化或纯化的样品，请直接进入第 4.C 节。

4.B 制备组织提取物或细胞裂解物

细胞裂解物和组织提取物中含有毫摩尔浓度的游离磷酸盐，会干扰该磷酸酶检测。此外，高浓度的 ATP 会增加本底，并由样品中污染的激酶导致磷酸化作用。因此，您需要从样品中去除这些成分。

使用的样品提取方法既可能影响磷酸酶的回收，也可能影响这些酶的抑制剂的存在状况。

4.B 制备组织提取物或细胞裂解物（接上页）

样品和柱制备

用户需提供的材料

（第 5 节提供了所需溶液的组分详情）

- 50ml 的一次性锥形离心管（例如，Corning Cat.# 430290）
 - 适当的磷酸酶储存缓冲液（详情请参考下述步骤 1 的注意事项）
 - Sephadex® G-25 储存缓冲液（用于储存制备好的柱子）
1. 向 1g 组织中加入 3ml 磷酸酶储存缓冲液并在 0-4° C 条件下匀浆 30 秒。
注意：磷酸酶储存缓冲液配方的选择取决于多个因素，包括要检测的是膜结合磷酸酶还是细胞质磷酸酶。磷酸酶储存缓冲液一般会包含还原剂、二价阳离子螯合剂和各种蛋白酶抑制剂。如果可在反应混合物中对样品进行适当稀释，可使用高达 1% 的去污剂（如 Triton® X-100）来制备膜结合磷酸酶。参考文献 21-24 提供了各种磷酸酶储存缓冲液的配方，可供参考。培养的细胞采用相同方法在磷酸酶储存缓冲液中匀浆，细胞量需自行调整。
 2. 将匀浆得到的裂解物以 100,000 × g 离心 1 小时（4° C），以除去其中的颗粒物。
注意：以 100,000 × g 离心裂解物 1 小时非常必要。裂解物必须如此严格地离心以去除其中的微粒体部分。如果裂解物没有清除干净，剩余的微粒体颗粒物可能会降低后续去除游离磷酸盐的效率（影响程度取决于残留颗粒的数量）。离心是去除颗粒物的最佳方法，离心速度不应降低。
 3. 在离心柱（指系统中的 Spin Column）中加入 10 ml 去离子水，然后让其沥干（依靠重力）。离心柱开始进行第一次排空液体时，请用 10ml 注射器对离心柱施加轻微压力，或轻摇离心柱。随附的适配器（Adaptor；蓝色圆环）允许离心柱用在大多数标准 50ml 一次性锥形离心管中进行离心（离心时无需盖子）。让离心柱中液体排入废液桶中。
 4. 通过轻轻摇动或用广口吸管吹吸来重悬 Sephadex® G-25 树脂。
 不要涡旋（vortex）或用磁力搅拌棒搅拌树脂。
 5. 用移液管吸取 10ml 重悬的 Sephadex® G-25 树脂悬浊液到离心柱中，使其在重力作用下排空流动相到一个备用的 50ml 管（或废液桶）中。从管中弃去流出的液体。
 6. 在色谱柱（指上一步骤准备的离心柱 + 树脂）中加入 10ml 冷的磷酸酶储存缓冲液（与制备样品所用相同）。
 7. 让色谱柱在重力作用下排空，并弃去流出到试管中的液体，然后用备用的 50ml 离心管以 600 × g 离心 5 分钟（4° C），以除去残余的附着在 Sephadex® 珠子周围的缓冲液。
 8. 将与适配器组装好的色谱柱放入提供的储液管（50ml 管）中，然后加入 250µl 组织提取物或细胞裂解物。（可使用更大体积的样品；详情请查阅步骤 9 后的注意事项）。
 9. 600 × g 离心 5 分钟（4° C），磷酸酶储存缓冲液中的裂解物样品将以加入时原始体积存在于储液管底部。
注意：
 1. 储液管中得到的样品流出相应含有 4-10% 的内源性磷酸盐（相比于未流经色谱柱的原始样品）。这个下降的磷酸盐含量应已足够低，可以在进行大多数实验时将本底降到最低。如果必须进一步去除更多磷酸盐，则将收集的样品流出相通过第二个色谱柱。如果要确定样品比活性（specific activities），需测量磷酸盐样品的蛋白质浓度。

2. 在步骤 8 中使用更大的样品量会降低去除游离磷酸盐的效率。例如，如果在步骤 8 中使用 500 μ l 样品，大约 85-90% 的内源性磷酸盐将被去除。
3. 离心柱可用至少 25ml 去离子水或无磷酸盐缓冲液洗涤（洗涤时依靠重力让流动相排出），并储存在 Sephadex[®] G-25 储存缓冲液中（使整个柱子浸没在储存缓冲液中）。将用过的湿润色谱柱（指上述已装入 Sephadex[®] G-25 树脂并浸没在储存缓冲液中的离心柱）保存在 4[°]C 下。按照第 4.B 节中的样品和离心柱制备说明，可重复使用离心柱和 Sephadex[®] G-25。即，可将保存在储存缓冲液中的色谱柱按照第 4.B 节第 5 步所述，排空流动相，接着按照第 6-7 步所述，用冷的磷酸酶储存缓冲液润洗色谱柱，最后按照第 8-9 步来处理样品。

4.C 磷酸酶检测操作方案

用户需提供的材料

（第 5 节提供了所需溶液的组分详情）

- 酶特异性 5X 反应缓冲液（PPase-2A 5X 反应缓冲液，PPase-2B 5X 反应缓冲液或 PPase-2C 5X 反应缓冲液）
1. 用提供的无磷水稀释提供的 1mM 磷酸盐标准品制成适当的稀释磷酸盐标准品，即以 1:20 的比例稀释提供的标准品，生成每微升含 50pmol（50 μ M）磷酸盐的溶液。用上述稀释标准品制备系列稀释标准液样品孔：每孔样品总体积为 50 μ l，分别加入 0、100、200、500、1,000 和 2,000pmol 稀释游离磷酸盐标准品和对应体积的 1X 反应缓冲液（分别为 50 μ l, 48 μ l, 46 μ l, 40 μ l, 30 μ l, 10 μ l），这些样品用于制作标准曲线。
 2. 直接在提供的 96 孔板（或其他选定的反应板 / 管）中配制适当的反应预混液（不包括酶样品），预混液应包括：10 μ l PPase 5X 反应缓冲液（详见第 5 节），5 μ l 1mM 磷酸盐。制备时注意不要产生气泡。
注意：反应预混液成分可包括底物、磷酸酶激活剂或抑制剂（抑制剂特异性信息见表 2）和合适的 PPase 5X 反应缓冲液（详见第 5 节）。最终反应总体积取决于检测形式。我们建议若使用提供的 96 孔半区微孔板则进行 50 μ l 反应；若使用标准 96 孔板则进行 50-100 μ l 反应；若使用本节步骤 7 中的标准一次性比色皿和分光光度计则进行 400 μ l 反应。
 3. 将包含反应预混液的 96 孔板置于所需的反应温度下 3 分钟（反应温度由用户根据研究的酶来选定）。
注意：控制反应温度的一种方法是将装有少量水的玻璃皿放入水浴中，使其温度达到平衡。之后 96 孔板可放置在平衡后的玻璃皿中，便于操作。
 4. 将酶样品（1-35 μ l）加入含有相应反应预混液的孔中，启动反应，并孵育反应所需时间（反应时间由用户根据研究的酶来选定）。（酶样品与反应预混液的总体积如步骤 2 所述，如果不足则用无磷水补齐；各实验组及对照组中酶样品的体积应相同。）适当的对照反应包括不加酶样品的反应、不加底物的反应以及按照下述步骤 5 中所述在零时终止完整反应（底物加酶样品）。
 5. 加入 50 μ l 第 4.A 节中制备的钼酸盐染料 / 添加剂混合物来终止反应。（这种混合物是强酸性，可以终止酶促反应，允许准确地控制反应时间。）应慎用 SDS 等其他终止溶液，因为这些试剂可能会与钼酸盐染料 / 添加剂混合物发生反应，产生高背景或降低检测灵敏度。
注意：本节步骤 1 中制备的含有系列稀释磷酸盐标准液的孔中此时同样加入 50 μ l 钼酸盐染料 / 添加剂混合物。如果您使用的是标准 96 孔板，请按照第 4.A 节所述加入等体积的钼酸盐染料 / 添加剂混合物。

4.C 磷酸酶检测操作方案（接上页）

6. 将 96 孔板置于室温条件，孵育 15 分钟。如果每个反应中的蛋白质超过 5 μg ，则将 96 孔板孵育 30 分钟，因为高浓度蛋白质会导致延迟显色。

显色完成后，溶液颜色至少在 2 小时内保持稳定。如果需要进行时程实验，只要确保最后一个时间点是在室温下有适当的显色时间，就可以通过在不同时间添加钼酸盐染料 / 添加剂混合物终止反应来进行时程检测。举例来说，如果反应能在 30min 室温孵育条件下完成显色，那么最理想的情况就是可以在反应进行的 0-1.5h 的不同时间点添加钼酸盐染料 / 添加剂混合物终止反应来进行酶反应的时程检测（具体操作时考虑到检测所需时间，0-1.5h 这个范围可能需要缩小）。

注意：如果每个反应中的蛋白质含量超过 5 μg ，则将 96 孔板孵育 30 分钟。高浓度蛋白质会导致延迟显色。

7. 使用带有 630nm 或 600nm 滤光片的微孔板读数仪读取样品的光密度（吸光度）。630nm 波长的滤光片会使实验样品和对照样品的吸光度值更高，背景值更高。



重要：孔中的气泡或平板底部的水滴会对吸光度读数产生不利影响。

表 2. 初步鉴定细胞 / 组织提取物和柱分馏产物中的磷酸酶的一般方法。

酶	磷酸肽底物		各种蛋白磷酸酶抑制剂存在条件下的酶活性					
	含磷酸酪氨酸的多肽	含磷酸苏氨酸的多肽	钒酸盐 Vanadate	氟化钠 NaF	EDTA (无 Mg^{2+})	EGTA (无 Ca^{2+})	冈田酸 Okadaic Acid	三氟拉嗪 Trifluorperazine
PTPases	++++	-	-	++++	++++	++++	++++	++++
PPase-2A	-	++++	++++	-	++++	++++	-	++++
PPase-2B	++	+++	++	-	++++	-	++++	-
PPase-2C	-	++++	++++	-	-	++++	++++	++++

++++ 高活性；

+++ 中度高活性；

++ 中等活性；

+ 低活性；

- 非常低的活性或没有能检测到的活性。

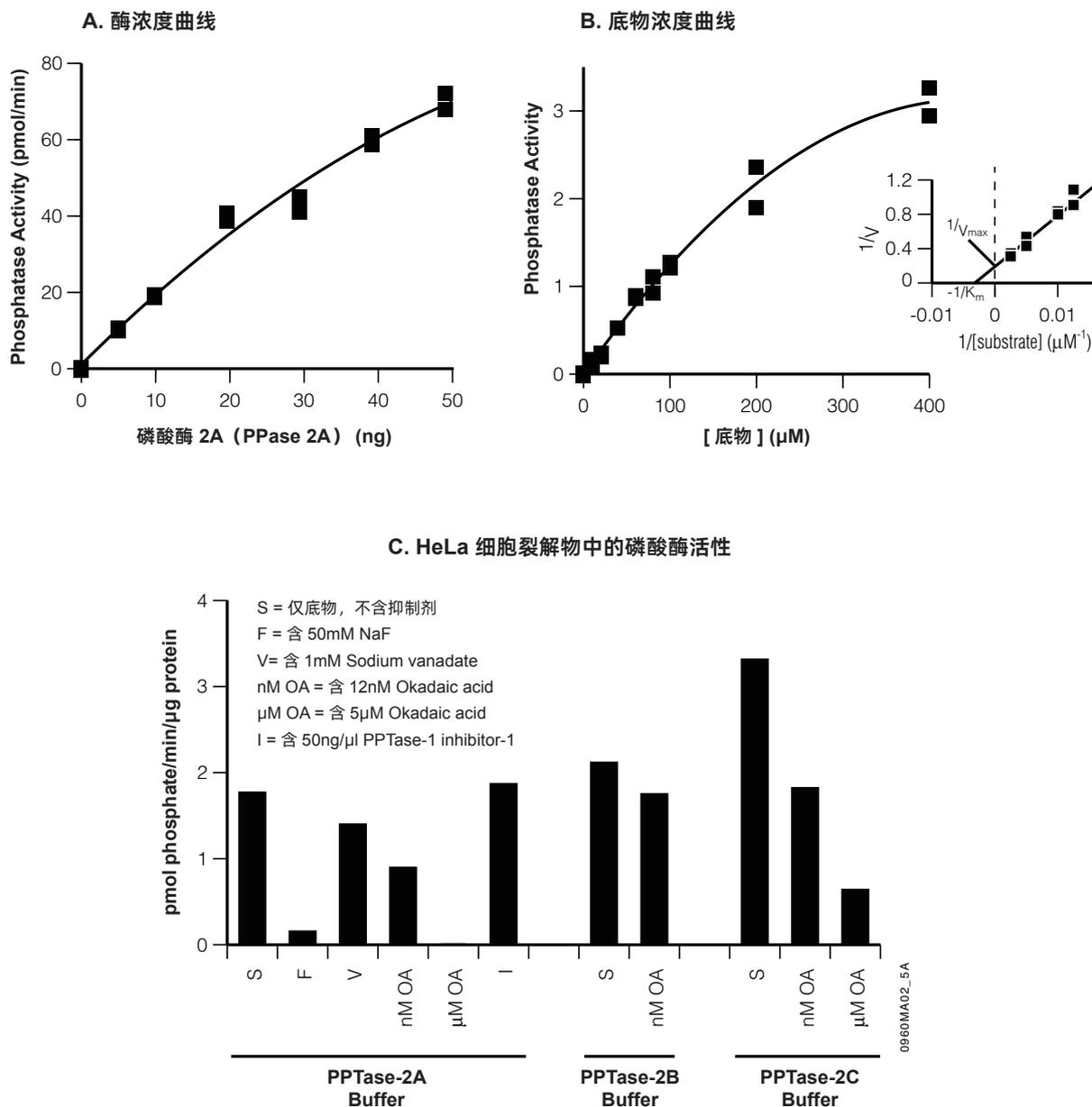


图 3. 使用所提供的磷酸肽生成的典型数据。纯化的蛋白磷酸酶 2A (PPase 2A) 在 30°C 与下列成分反应 10 分钟：(图 A) PPase-2A 缓冲液中的 200 μM Ser/Thr 磷酸肽，以及 (图 B) PPase-2A 缓冲液中不同浓度的 Ser/Thr 磷酸肽。图 B 中插入图部分以 Lineweaver-Burk 图 (双倒数作图法) 的形式显示了数据的动力学分析，测定的 K_m 为 310 μM ， V_{max} 为 5.3nmol/minute/ μg 。图 C 展示的数据使用 HeLa 细胞裂解物 (250 μl) 获得，该细胞裂解物使用提供的 Sephadex[®] G-25 色谱柱过滤一次以去除游离磷酸盐。图 C 实验中，样品与底物 (100 μM Ser/Thr 磷酸肽) 在含或不含抑制剂的条件下孵育 30min，测试的抑制剂条件包括：50mM 氟化钠 (NaF)，1mM 钒酸钠，12nM 冈田酸，5 μM 冈田酸和 50ng/ μl PPase-1 inhibitor-1。磷酸酶活性呈现底物依赖性，对高浓度的蛋白酪氨酸磷酸酶抑制剂钒酸钠相对不敏感，但对丝氨酸 / 苏氨酸磷酸酶抑制剂氟化钠处理呈现明显抑制作用。有关抑制剂特异性的信息，请参见表 2。缓冲液的成分见第 5 节。

5. 缓冲液和溶液组分

Sephadex® G-25 储存缓冲液

10mM	Tris (pH 7.5)
1mM	EDTA
0.02%	叠氮化钠

磷酸盐标准品

1mM	KH ₂ PO ₄
-----	---------------------------------

PPase-2A 5X 反应缓冲液

250mM	咪唑 (pH 7.2)
1mM	EGTA
0.1%	β- 巯基乙醇
0.5mg/ml	BSA

PPase-2B 5X 反应缓冲液

250mM	咪唑 (pH 7.2)
1mM	EGTA
50mM	MgCl ₂
5mM	NiCl ₂
250μg/ml	钙调蛋白
0.1%	β- 巯基乙醇

PPase-2C 5X 反应缓冲液

250mM	咪唑 (pH 7.2)
1mM	EGTA
25mM	MgCl ₂
0.1%	β- 巯基乙醇
0.5mg/ml	BSA

6. 相关产品

发光法通用型激酶测定

产品	规格	目录号
Kinase-Glo [®] Max Luminescent Kinase Assay	10ml*	V6071
Kinase-Glo [®] Plus Luminescent Kinase Assay	10ml*	V3771
Kinase-Glo [®] Luminescent Kinase Assay	10ml*	V6711

* 还有其他规格可供选择。

放射性同位素方法激酶测定

产品	规格	目录号
SignaTECT [®] Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Assay System	96 reactions	V8161

7. 参考文献

1. Van Veldhoven, P.P. and Mannaerts, G.P. (1987) Inorganic and organic phosphate measurements in the nanomolar range. *Anal. Biochem.* **161**, 45–8.
2. Ekman, P. and Jäger, O. (1993) Quantification of subnanomolar amounts of phosphate bound to seryl and threonyl residues in phosphoproteins using alkaline hydrolysis and malachite green. *Anal. Biochem.* **214**, 138–41.
3. Harder, K.W. et al. (1994) Characterization and kinetic analysis of the intracellular domain of human protein tyrosine phosphatase beta (HPTP beta) using synthetic phosphopeptides. *Biochem. J.* **298**, 395–401.
4. Cohen, P. (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 453–508.
5. Hunter, T. et al. (1992) Receptor protein tyrosine kinases and phosphatases. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **57**, 25–41.
6. Walton, K.M. and Dixon, J.E. (1993) Protein tyrosine phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 101–20.
7. Shenolikar, S. (1994) Protein serine/threonine phosphatases—new avenues for cell regulation. *Annu. Rev. Cell Biol.* **10**, 55–86.
8. Hunter, T. (1995) Protein kinases and phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **80**, 225–36.
9. Hooft van Huijsduijnen, R. (1998) Protein tyrosine phosphatases: Counting the trees in the forest. *Gene* **225**, 1–8.
10. Goldberg, Y. (1999) Protein phosphatase 2A: Who shall regulate the regulator? *Biochem. Pharmacol.* **57**, 321–8.
11. Denu, J.M. and Dixon, J.E. (1998) Protein tyrosine phosphatases: Mechanisms of catalysis and regulation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 633–41.
12. Berndt, N. (1999) Protein dephosphorylation and the intracellular control of the cell number. *Front. Biosci.* **4**, D22–D42.
13. Burke, T.R. and Zhang, Z.Y. (1998) Protein-tyrosine phosphatases: Structure, mechanism, and inhibitor discovery. *Biopolymers* **47**, 225–41.
14. Oliver, C.J. and Shenolikar, S. (1998) Physiologic importance of protein phosphatase inhibitors. *Front. Biosci.* **3**, D961–72.
15. Stoker, A. and Dutta, R. (1998) Protein tyrosine phosphatases and neural development. *Bioessays* **20**, 463–72.
16. Keyse, S.M. (1998) Protein phosphatases and the regulation of MAP kinase activity. *Semin. Cell Dev. Biol.* **9**, 143–52.
17. Zhang, Z.Y. (1998) Protein-tyrosine phosphatases: Biological function, structural characteristics, and mechanism of catalysis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **33**, 1–52.
18. Daum, G. et al. (1993) A general peptide substrate for protein tyrosine phosphatases. *Anal. Biochem.* **211**, 50–4.

19. Zhang, Z.Y. et al. (1993) Substrate specificity of the protein tyrosine phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 4446–50.
20. Donella-Deana, A. et al. (1990) An investigation of the substrate specificity of protein phosphatase 2C using synthetic peptide substrates; comparison with protein phosphatase 2A. *Biochim. Biophys. Acta* **1051**, 199–202.
21. Tonks, N.K., Diltz, C.D. and Fischer, E.H. (1988) Purification of the major protein tyrosine-phosphatases of human placenta. *J. Biol. Chem.* **263**, 6722–30.
22. Cohen, P. et al. (1988) Protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2A from rabbit skeletal muscle. *Meth. Enzymol.* **159**, 390–408.
23. Zhao, Z. et al. (1993) Purification and characterization of a protein tyrosine phosphatase containing SH2 domains. *J. Biol. Chem.* **268**, 2816–20.
24. Zhao, Z. et al. (1994) Purification and characterization of PTP2C, a widely distributed protein tyrosine phosphatase containing two SH2 domains. *J. Biol. Chem.* **269**, 8780–5.

For peer-reviewed articles citing use of the Serine/Threonine Phosphatase Assay System, please visit:
www.promega.com/citations/

© 1995, 1999, 2005, 2007–2009, 2017 Promega Corporation. All Rights Reserved. Kinase-Glo, ProFluor and SignaTECT are registered trademarks of Promega Corporation.

Costar is a registered trademark of Corning, Inc. Sephadex is a registered trademark of GE Healthcare Bio-sciences. Triton is 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 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.