

中文说明书

激酶系统 (KES) 基于
ADP-Glo™ 分析方法的
使用方案



激酶系统 (KES) 用于 ADP-Glo™ 分析方法的 使用方案

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. 进行 ADP-Glo™ 检测的操作方法	4
2. A. 制备 Kinase Detection Reagent	4
2. B. 为 ATP 到 ADP 的转化生成标准曲线	5
2. C. 使用 ADP-Glo™ 检测方法对激酶反应进行检测的操作方案	5
3. 生成一种激酶抑制剂的剂量 - 反应曲线的操作方案示例 (以 Staurosporine 为例)	6
3. A. 激酶滴定并测定 SB ₁₀	6
3. B. 生成抑制剂 Staurosporine 剂量 - 反应曲线的操作方法	10
4. 一般注意事项	13
5. 参考文献	16
6. 修订总结	16

1. 概述

Promega 提供的激酶系统 (Kinase Enzyme System, KES) 中包括了, 一份纯化的重组表达激酶, 一份该激酶适用的底物, 一份反应缓冲液, 以及相应激酶反应所需的补充成分。激酶系统 (KES) + ADP-Glo™ Assay 的产品组合为分析化合物对激酶活性的影响提供了一种非常方便的方法。这份使用方案是为已获取激酶系统 (Kinase Enzyme System) 而且计划与 ADP-Glo™ Assay 组合使用的研究者设计的, 以帮助使用者快速地开展和建立实验流程。

ADP-Glo™ Kinase Assays (Cat.# V6930, V9101, V9102) 是基于生物发光法的 ADP 检测方法。它提供通用型、均质、可进行高通量筛选的实验方案。这个检测方法通过定量激酶反应过程中产生的 ADP 的数量来测定激酶的活性, 检测中产生的发光信号强度与激酶活性呈正比。这个检测方法非常适合用于测量化合物对广泛的纯化激酶活性的影响, 使它可以成为初级筛选和激酶选择性分析的理想检测方案。ADP-Glo™ Kinase Assay 可用于监测几乎任何 ATP 用量不超过 1mM 的 ADP 生成酶 (例如, 激酶或 ATP 酶) 的活性。Promega 还提供 ADP-Glo™ Max Assays (Cat.# V7001, V7002), 可以用于需要更高浓度 ATP (不超过 5mM) 的情况。

在激酶反应完成之后, 这个检测方法以两个步骤来实现。第一步, 加入与激酶反应体系等体积的 ADP-Glo™ Reagent, 这一步骤会终止激酶反应并耗尽体系中剩余的 ATP (将其转化为无关检测的产物)。第二步, 加入 Kinase Detection Reagent, 这一步骤会将激酶反应过程中生成的 ADP 转化为新的 ATP, 同时使得新合成的 ATP 通过萤光素酶 / 萤光素反应被检测 (图 1)。上述检测反应产生的光信号可以用化学发光检测仪来测定。发光信号强度与激酶反应中产生的 ADP 的数量, 即激酶活性呈正比。生成并使用 ATP 到 ADP 转化曲线, 可以使发光信号与 ADP 浓度相关联 (图 2)。

ADP-Glo™ Kinase Assay 具有高动态范围, 并且在低 ATP 到 ADP 转化的情况下也可以产生强检测信号, 使其非常适合筛选低活性激酶, 如生长因子受体酪氨酸激酶。该检测方法产生最小的错误命中, 且 Z' 值大于 0.7 (1)。

ADP-Glo™ Kinase Assay 与基于放射性检测的方法一样灵敏, 比基于荧光检测的方法更灵敏 (1-3)。为了降低背景并进一步提高检测的灵敏度, 我们提高了该检测系统中提供的 ATP 的纯度, 以减少 ADP 污染。为了评估 ATP 纯度对 ADP-Glo™ 检测灵敏度的重要性, 我们比较了使用 Promega 超纯 ATP 和其他供应商的 ATP, 在 ADP-Glo™ 检测中产生的信号背景比。结果显示, Promega 超纯 ATP 优于其他来源的 ATP, 大大提高了 ADP-Glo™ 检测灵敏度, 比使用其他供应商的 ATP 产生的 SB 比值高出 2-3 倍 (4)。

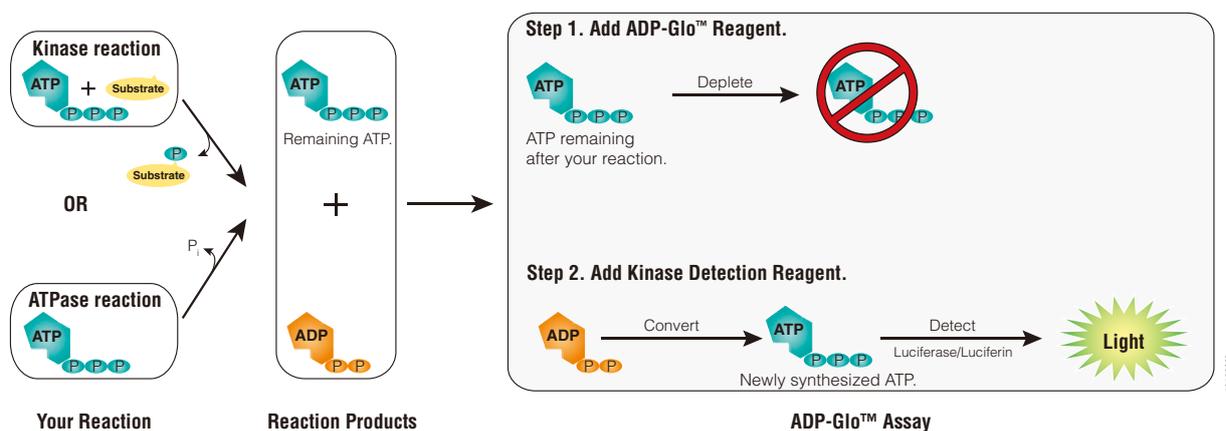


图 1. ADP-Glo™ 检测方法原理示意。 这个检测方法包括两个步骤。在激酶或 ATP 酶反应完成后, 第一步, 加入 ADP-Glo™ Reagent, 这一步骤会终止激酶反应并耗尽体系中剩余的任何 ATP (需要 40 分钟的孵育时间)。第二步, 加入 Kinase Detection Reagent, 这一步骤会将激酶反应过程中生成的 ADP 转化为新的 ATP, 同时使得新合成的 ATP 参与萤光素酶 / 萤光素反应从而产生发光信号 (根据激酶反应中使用的 ATP 浓度的不同, 孵育时间为 30-60 分钟)。发光信号强度与激酶反应中产生的 ADP 的数量, 即激酶或 ATP 酶活性呈正比。这个检测过程在室温下进行, 并且可以兼容自动化操作。

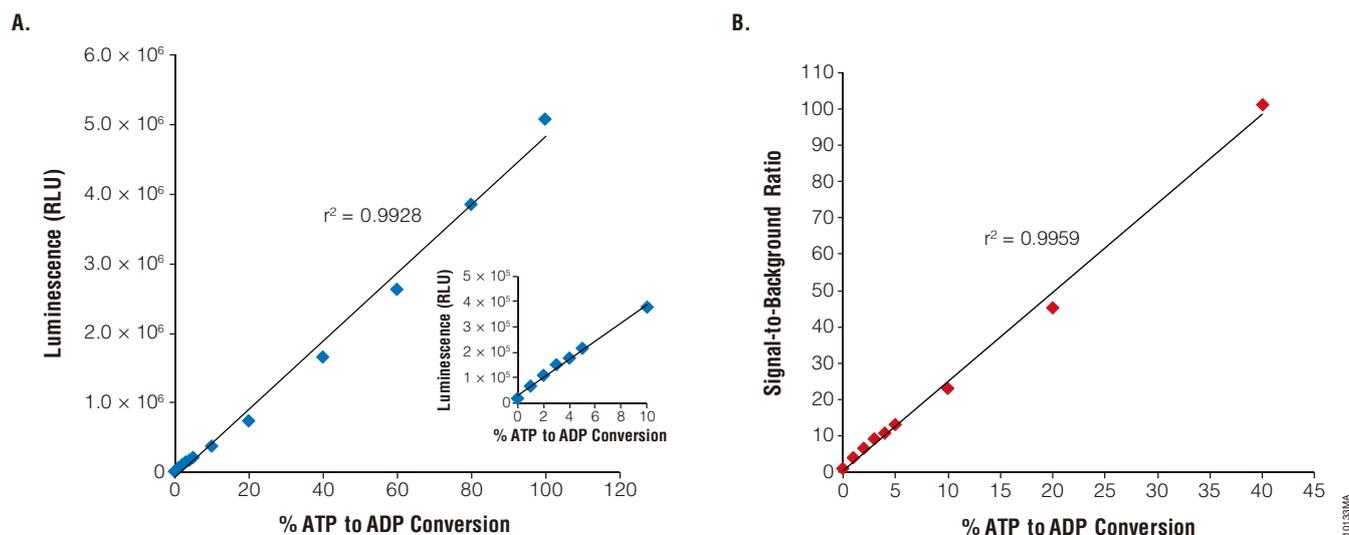


图 2. ADP-Glo™ Kinase Assay 的线性和灵敏度。 依照 ADP-Glo™ Kinase Assay 技术手册 #TM313 所述，使用不含激酶的 1X 反应缓冲液 A (40mM Tris [pH 7.5], 20mM MgCl₂ 及 0.1mg/ml BSA) 制备 1mM 浓度下的 ATP 到 ADP 百分比转化曲线 (标准曲线) (5)。其中所用标准品是由适当体积的 1mM 的 ATP 和 1mM 的 ADP 储备液混合而成。从制备好的每个 ATP + ADP 标准品中取 5μl 转移到一个白色的、不透明的 384 孔板中。ADP-Glo™ Kinase Assay 通过在室温下向每孔加入 5μl ADP-Glo™ Reagent 和 10μl Kinase Detection Reagent 进行。ADP-Glo™ assay 的试剂是使用 Multidrop™ Combi nL 试剂分液器 (Thermo Fisher Scientific) 分配到 384 孔板中。发光值代表四次重复的平均值 (RLU = relative light units)。**Panel A.** 测定线性可达 1mM ADP。**Panel B.** 以大范围内 ATP 到 ADP 转化百分比的信号背景比 (signal-to-background ratios, SB) 来展示检测的灵敏度。

2. 进行 ADP-Glo™ 检测的操作方法

注意：将 Kinase Enzyme System 中的组分保存在 -70°C 。为了最佳的保存效果，建议离心混匀后将目标试剂分装成多个小份，并在推荐的温度下存储。为了获得最佳性能，应避免对试剂进行反复处理和多次冻融循环。从装运日期算起，Kinase Enzyme System 中的组分在 -70°C 可以稳定保存一年。

用户需提供的材料

- ADP-Glo™ Kinase Assay 试剂盒 (Cat.# V6930, V9101, V9102, V9103, V9104)，或 ADP-Glo™ Max Assay 试剂盒 (Cat.# V7001, V7002)，以及相关的操作手册 (ADP-Glo™ Kinase Assay 技术手册 #TM313 或 ADP-Glo™ Max Assay 技术手册 #TM343)
- 不透光的白色多孔板 (不要使用黑色检测板)
- 多通道加样器或自动移液工作站
- 微孔板震荡仪
- 可读取多孔板的化学发光检测仪

注：ADP-Glo™ Kinase Assay 中一般包括检测所需的

- Ultra Pure ATP
- ADP
- ADP-Glo™ Reagent
- Kinase Detection Substrate 及 Kinase Detection Buffer

2.A. 制备 Kinase Detection Reagent

1. 在室温下解冻 Kinase Detection Buffer，注意观察其中是否有沉淀。
2. 如果存在沉淀，将 Kinase Detection Buffer 置于 37°C 并持续晃动，约 15 分钟。
3. 将 Kinase Detection Buffer 和 Kinase Detection Substrate 在使用前平衡至室温。
4. 将全部的 Kinase Detection Buffer 转移到盛放 Kinase Detection Substrate 的琥珀色瓶中，复溶冻干底物，这就制备好了 Kinase Detection Reagent。
5. 通过轻柔地涡旋、打圈晃动或颠倒内容物来混匀试剂，以获得均匀的溶液。冻干粉状的 Kinase Detection Substrate 应该会在不到 1 分钟内就被完全地溶解。
6. Kinase Detection Reagent 应当被立即使用，或者被等分成小份储存在 -20°C 。Kinase Detection Reagent 在 10 个冻融循环内是稳定的。

2.B. 为 ATP 到 ADP 的转化生成标准曲线

为了评估反应中产生的 ADP 的量，我们建议根据激酶或 ATP 酶反应中使用的 ATP 浓度，创建一条代表 ATP 转化为 ADP 与发光强度相对应的标准曲线（“ATP 到 ADP 转化曲线”）。这些标准曲线代表了在指定的转换百分比下反应中可用的 ATP 和 ADP 的量（表 1）。绘制 ATP 到 ADP 标准曲线所用的标准样品是由相应浓度的适当体积的 ATP 和 ADP 储备液混合而成。关于生成标准曲线的更多详细信息，请参阅 *ADP-Glo™ Kinase Assay 技术手册 #TM313(5)* 或 *ADP-Glo™ Max Assay 技术手册 #TM343(6)* 的第 3.A 章节。

表 1. 以标准曲线表示的 ATP 到 ADP 的百分比转化率。

	孔 1	孔 2	孔 3	孔 4	孔 5	孔 6	孔 7	孔 8	孔 9	孔 10	孔 11	孔 12
%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

2.C. 使用 ADP-Glo™ 检测方法对激酶反应进行检测的操作方案

1. 使用 1X 激酶缓冲液进行激酶反应（请查阅第 3 章节获取详细信息）。
2. 加入与激酶反应等体积的 ADP-Glo™ Reagent 以终止激酶反应并耗尽反应未使用的 ATP，只留下 ADP 和非常低的 ATP 背景。
3. 在室温孵育 40 分钟。
4. 加入与上述混合物（激酶反应 + ADP-Glo™ Reagent）等体积的 Kinase Detection Reagent，将 ADP 转化为 ATP，同时引入萤光素酶和萤光素检测新转化的 ATP。
5. 在室温孵育 30–60 分钟。
6. 使用一台可读取微孔板的化学发光检测仪，或者电荷耦合器件相机（CCD 相机），来读取发光信号。

注意：ATP 经过冻融循环后容易自然水解，建议第一次融化混匀后分装成单次使用的等分液，并在 -20° C 存储，为了获取最可靠的存储效果，最好保存在 -65° C 以下，ATP 水解会显著增加检测背景。稀释后的 Reaction Buffer A (5X)、ATP、ADP 等需当次使用，不应当保存后重复使用。

以上第 2 章节是对 ADP-Glo™ Kinase Assay Systems 使用方法的一个总体描述。具体操作细节和注意事项请查阅相应产品的技术手册。如果需要使用 ADP-Glo™ Kinase Assay Systems 筛选激酶抑制剂，请查阅 *ADP-Glo™ Kinase Assay 技术手册 #TM313 (5)*，或 *ADP-Glo™ Max Assay 技术手册 #TM343 (6)*，以获取相应的使用方法。

3. 生成一种激酶抑制剂的剂量 - 反应曲线的操作方案示例 (以 Staurosporine 为例)

为了确定后续用于抑制剂的剂量 - 反应曲线测定的最佳酶用量, 我们建议首先进行激酶滴定。为了评估在激酶反应中产生的 ADP 的量, 需要创建一条 ADP 产生量的标准曲线, 即“ATP 到 ADP 转化曲线”。这条曲线表示 ATP 到 ADP 转化的每个百分比与发光强度 (RLU) 的对应关系, 需根据激酶反应中使用的 ATP 浓度建立。用于生成 ATP 到 ADP 转化曲线的标准样品, 是由相应浓度的适当体积的 ATP 和 ADP 储备液混合而成。当同时操作多个激酶系统的检测时, 将使用相似 ATP 浓度的激酶滴定和 ATP 到 ADP 转化曲线放在同一个检测平板上进行。

利用转化曲线上的参考 RLU 值可以计算每个酶用量产生的 ADP 转化百分比。通过滴定激酶, 我们将测定 SB_{10} (我们将 SB_{10} 定义为产生的信号背景比为 10 倍时所需要的酶的用量)。 SB_{10} 值是产生体现激酶反应初始速率的百分转化率所需的激酶量。我们通常使用 5% 或 10% 转化, 因为它通常产生大于 10 倍的信号背景比。

使用 SB_{10} 量的激酶来进行激酶抑制剂的剂量 - 反应曲线测定 (Staurosporine 为例), 计算 IC_{50} , 并检查是否有无法被抑制的 ATP 酶污染活性。

需要使用 5X Reaction Buffer A 制备的反应缓冲液

5X Reaction Buffer A (KES 试剂盒组分): 包括 200mM Tris [pH 7.5], 100mM $MgCl_2$ 及 0.5mg/ml BSA

- 4X Kinase Buffer: 包括 4X Reaction Buffer A + 200 μ M DTT + (4X 任何需要的辅助因子, 如 $MnCl_2$)
- 4X Kinase Buffer D: 包括 4X Reaction Buffer A + 200 μ M DTT + 4% DMSO + (4X 任何需要的辅助因子, 如 $MnCl_2$)
- 1X Kinase Buffer: 由 4X Kinase Buffer 用水稀释到 1x 获得
- 1X Kinase Buffer D: 由 4X Kinase Buffer D 用水稀释到 1x 获得
- 1X Kinase Buffer (5% DMSO): 由 4X Kinase Buffer 用水稀释到 1x, 同时向其中添加 DMSO 至终浓度为 5%

注意: 以上所列举为各个反应缓冲液中成分的终浓度, 需根据实际需要的体积计算具体的缓冲液配制方案。KES 系列中激酶所用的 1X Kinase Buffer 配方, 会列举在对应的应用说明 (Application Note; 详见第 4 章节)

注意: 以下方案中描述的体积都是按照每个样品两个复孔来规划的。如果您的实验中每个样品会使用两个以上的重复孔, 请根据实际情况重新计算所需的试剂体积。

在室温下进行所有步骤的操作 (22–25° C)。

3.A. 激酶滴定并测定 SB_{10}

生成 ATP 到 ADP 转化曲线

1. 用水稀释试剂盒中提供的 ATP 和 ADP 原液, 来准备 1mM 或 10mM ATP 和 ADP 储备液 (根据具体使用的原液浓度来决定稀释方法)。
2. 为 10X 转化曲线标准品做准备: 如表 2 所示, 用水和上述 1mM 或 10mM ATP 和 ADP 储备液, 制备相当于最终检测浓度的 10 倍的 ADP 和 ATP 储备液, 之后需要用它们来配制 100 μ l 的 ATP/ADP 标准品储备液。您需要准备 1ml 10X ATP 储备液和 500 μ l 10X ADP 储备液。

注意: 应当根据您的激酶反应中使用的 ATP 浓度来准备对应的转化曲线。如果您的实验计划中只会用到一个 ATP 工作浓度, 那么只需要准备这一个对应浓度的 10x 储备液样品。KES 系列中激酶反应用到的 ATP 浓度建议, 请查阅本手册第 4 章节。

表 2. ATP 和 ADP 储备溶液的准备方案。

	反应所需的终浓度	要准备的 10x 储备液浓度	需要的 1mM ATP 储备液体积 (μl)	需要的水的体积 (μl)
ATP	1μM	10μM	10	990
	5μM	50μM	50	950
	10μM	100μM	100	900
	反应所需的终浓度	要准备的 10x 储备液浓度	需要的 10mM ATP 储备液体积 (μl)	需要的水的体积 (μl)
	100μM	1.0mM	100	900
	250μM	2.5mM	250	750
	500μM	5mM	500	500
ADP	反应所需的终浓度	要准备的 10x 储备液浓度	需要的 1mM ADP 储备液体积 (μl)	需要的水的体积 (μl)
	1μM	10μM	5	495
	5μM	50μM	25	475
	10μM	100μM	50	450
	反应所需的终浓度	要准备的 10x 储备液浓度	需要的 10mM ADP 储备液体积 (μl)	需要的水的体积 (μl)
	100μM	1.0mM	50	450
	250μM	2.5mM	125	375
500μM	5mM	250	250	

3. 当您按照上一步骤准备好了 ATP 和 ADP 的 10 倍浓度储备液之后，请按照表 3 所示，通过转移对应体积的每个溶液来制备成 10x 转化曲线标准品储备液。

表 3. 10X 转化曲线标准品储备液制备方案。

	孔 1	孔 2	孔 3	孔 4	孔 5	孔 6	孔 7	孔 8	孔 9	孔 10	孔 11	孔 12
百分比转化率	100	80	60	40	20	10	5	4	3	2	1	0
10xADP 储备液 (μl)	100	80	60	40	20	10	5	4	3	2	1	0
10xATP 储备液 (μl)	0	20	40	60	80	90	95	96	97	98	99	100

3.A. 激酶滴定并测定 SB₁₀ (续)

重要注意事项：使用制备转化曲线标准品储备液剩余的 100% ATP (即, 第 3.A 章节第 2 步制备的 10xATP 储备液) 进行相应的激酶反应, 以获得相似的背景水平。

4. **制备稀释在 1X 激酶反应缓冲液中的 1X ADP/ATP 标准品工作液保存板：**准备一个 96 孔板用于制备 1X ADP/ATP 标准品工作液。取 105 μ l 的 4X Kinase Buffer D 与 273 μ l 的水混匀。将该混合液按照 27 μ l/ 孔, 转移至上述 96 孔板, 然后移取各百分比转化率的 10X 转化曲线标准品储备液 3 μ l 到每个对应的孔内。这一步得到的每个转化率对应的标准品工作液体积为 30 μ l, 足够进行 4 个重复检测 (包括富余的体积)。

准备激酶滴定所需的组分

注意：KES 系列中激酶滴定的相关建议, 请查阅本手册第 4 章节。

1. 激酶滴定检测应使用与 ATP 到 ADP 转化曲线相同的 ATP 浓度。
2. **制备底物混合物：**取一个 1.5ml 管, 为每一种激酶制备 200 μ l 2.5X ATP/Substrate Mix (2.5 倍终浓度的 ATP 与激酶底物的混合物)。请参考表 4 作为一个配制指导方案 (表 4 以 10 μ M ATP 反应终浓度为例)。

注意：此处使用的 ATP 应当与制备转化曲线所用的是同一管 10XATP。

表 4. 制备 2.5X ATP/Substrate Mix.

所需组分	所需体积
4X Kinase Buffer D	50 μ l
100 μ M ATP (10XATP 储备液)	50 μ l
Substrate (1mg/ml)*	100 μ l

* 如果底物是 MBP、酪蛋白或组蛋白 H1, 则将 100 μ l 底物替换为使用 50 μ l 底物和 50 μ l 水

3. 取一个 384 孔板, 向 384 孔板第 **X 排**, 每一个奇数列 (1,3,5...23) 的孔里各转移 14 μ l 2.5X ATP/Substrate Mix。这一排就是您的待用 *ATP/Substrate 排*。
4. **为制备酶的稀释液做准备：**向上述 384 孔板第 **Y 排**, 第 3 列开始的每一个奇数列 (3,5...23) 的孔里各加入 10 μ l 1X Kinase Buffer D。这一过程中不要向第 Y 排第 1 列的孔里添加任何试剂。这一排就是您的待用 *Kinase Dilution 排*。
5. 如表 5 所示, 制备 20 μ l 的激酶溶液 (计划的激酶稀释液最终使用量为: 3 μ l/ 反应 / 孔)。按照表 5 所示方法制备, 得到的起始激酶反应量为 200ng 激酶 /3 μ l。

表 5. 激酶稀释液准备溶液。

所需组分	所需体积
Water	1.67 μ l
4X Kinase Buffer D	5 μ l
Kinase (100ng/ μ l)	13.33 μ l

6. 向待用 *Kinase Dilution* 排的孔 Y1 (第 Y 排第 1 列孔) 中添加 20 μ l 激酶溶液 (第 3.A 节第 5 步中按照表 5 制备)。以此为始, 如图 3 所示, 制备激酶的 1:1 系列稀释液。每个稀释过程中用移液器混匀后再转移 10 μ l 相应液体到下一孔, 直到第 21 列。不要转移任何激酶溶液到孔 Y23, 这一孔是无激酶的背景对照组 (background)。完成后, 此即为待用 *kinase titration* 排。

孔编号 #	计划的每个反应 激酶用量	每一孔的起始体积	需要转移的溶液体积
1	200ng	20 μ l	10 μ l
3	100ng	10 μ l	10 μ l
5	50ng	10 μ l	10 μ l
7	25ng	10 μ l	10 μ l
9	12.5ng	10 μ l	10 μ l
11	6.25ng	10 μ l	10 μ l
13	3.12ng	10 μ l	10 μ l
15	1.56ng	10 μ l	10 μ l
17	0.78ng	10 μ l	10 μ l
19	0.39ng	10 μ l	10 μ l
21	0.1953ng	10 μ l	0 μ l
23	0	10 μ l	无转移, 仅 buffer



注意: 请避免在制备系列稀释液时产生气泡。

图 3. 制备激酶的 1:1 系列稀释液。

7. 激酶反应和转化曲线实验: 从您的 *1X ADP/ATP 标准品工作液保存板* 中的每个稀释好的 ATP-ADP 系列标准样品中, 移取 5 μ l (每个标品两个重复) 到您的 384 孔检测板 (白色不透光平板) 指定给转化曲线样品的位置。
8. 从第 Y 排, 待用 *kinase titration* 排的每个样品孔内, 移取 3 μ l 激酶样品 (每个样品两个重复) 到上述 384 孔检测板指定用于激酶滴定反应的位置。
9. 从第 X 排, 待用 *ATP/Substrate* 排的每个对应位置的孔中, 移取 2 μ l 2.5X ATP/Substrate Mix 到对应的已加入激酶样品的孔中 (例如从孔 X23 中分别取 2 μ l Mix 到孔 Y23 样品所在的两个复孔中)。
10. 离心上述 384 孔检测板。用微孔板震荡仪混匀 2 分钟。在室温下反应 60 分钟, 或其他期望的时间。
11. 用 **ADP-Glo™ Kinase Assay 检测 ADP**: 激酶反应孵育完成后, 在所有待检测孔中加入 5 μ l ADP-Glo™ Reagent。混匀 2 分钟, 室温孵育 40 分钟。
12. 在上述所有待测孔中加入 10 μ l Kinase Detection Reagent。混匀 2 分钟, 室温孵育 30-60 分钟。
13. 测量发光信号 (整合时间 0.5 秒)。
14. 计算 SB₁₀ 值 (ng 或 nM)。SB₁₀ 是产生的信号背景比为 10 倍时所需要的激酶的量 (通常这个激酶量产生 5% 到 10% 的百分比转化率)。信号背景比的计算方法为: SB ratio=RLU (kinase) /RLU (background)

3.B. 生成抑制剂 Staurosporine 剂量 - 反应曲线的操作方法

注意：KES 系列中激酶用 Staurosporine 或激酶特异性抑制剂生成量效曲线的相关建议，请查阅本手册第 4 章节。

1. **制备抑制剂滴定所需的组分：**准备一个 96 孔板，向 A/B 两排的孔 A2-A12 及 B1-B12 中各加入 50 μ l 1X Kinase Buffer D (包含 5% DMSO)。这些就是 *待用抑制剂滴定排*。

注意：不要向孔 A1 中添加缓冲液。

2. 按表 6 制备 100 μ l 50 μ M Staurosporine 溶液 (含 5% DMSO) (计划抑制剂最终用量：1 μ l/ 反应 / 孔)。这样得到的最终反应中的 Staurosporine 起始浓度为 10 μ M (1% DMSO)。

表 6. Staurosporine 溶液制备。

所需组分	所需体积
Water	70 μ l
4X Kinase Buffer	25 μ l
Staurosporine in DMSO (1mM)	5 μ l

3. 将上一步骤制备好的 100 μ l Staurosporine 溶液添加到待用抑制剂滴定排的孔 A1 中。以此为始，如图 4 所示，制备抑制剂的 1:1 系列稀释液。每个稀释过程中用移液器混匀后再转移相应液体到下一孔。

注意：请避免在准备系列稀释液时产生气泡。

孔编号 #	计划的每个反应抑制剂终浓度	每一孔的起始体积	需要转移的溶液体积
A1	10,000nM	100µl	50µl
A2	5,000nM	50µl	50µl
A3	2,500nM	50µl	50µl
A4	1,250nM	50µl	50µl
A5	625nM	50µl	50µl
A6	312.5nM	50µl	50µl
A7	156.3nM	50µl	50µl
A8	78.1nM	50µl	50µl
A9	39.1nM	50µl	50µl
A10	19.5nM	50µl	50µl
A11	9.8nM	50µl	50µl (转移到孔 B1)
A12	0	50µl	无转移, 只有 Buffer
B1	4.88nM	50µl	50µl
B2	2.44nM	50µl	50µl
B3	1.22nM	50µl	50µl
B4	0.61nM	50µl	50µl
B5	0.31nM	50µl	50µl
B6	0.15nM	50µl	50µl
B7	0.08nM	50µl	50µl
B8	0.04nM	50µl	50µl
B9	0.02nM	50µl	50µl
B10	0.01nM	50µl	0µl (无转移)
B11	0	50µl	无转移, 只有 Buffer
B12	0 (无激酶对照)	50µl	无转移, 只有 Buffer

图 4. 制备抑制剂的 1:1 系列稀释液。

3.B. 生成抑制剂 Staurosporine 剂量 - 反应曲线的操作方法 (续)

4. 准备激酶反应组分, 以 10 μ M ATP 反应为例: 按照表 7 的描述为每一种激酶制备 200 μ l 2.5X ATP/Substrate Mix。
5. 取一个 384 孔板。向 384 孔板第 X 排, 每一个奇数列 (1,3,5...23) 的孔里各转移 14 μ l 2.5X ATP/Substrate Mix。这一排就是您的 待用 ATP/Substrate 排。
6. 按表 8 所示制备 140 μ l 激酶溶液 (按照 2 μ l/ 反应 / 孔, 可做 70 个反应且有富余量)。按照该计划最终反应中激酶用量等于 SB₁₀ (ng 激酶 / 反应)。

表 7. 底物混合物制备。

所需组分	所需体积
4X Kinase Buffer	50 μ l
100 μ M ATP (10XATP 储备液)	50 μ l
Substrate (1mg/ml)*	100 μ l

* 如果底物是 MBP、酪蛋白或组蛋白 H1, 则将 100 μ l 底物替换为使用 50 μ l 底物和 50 μ l 水

表 8. 激酶溶液制备。

所需组分	所需体积
Kinase (100ng/ μ l)	X μ l = (70 \times SB ₁₀ /100)
4X Kinase Buffer	35 μ l
Water	Y μ l = 105 μ l - X

7. 向上述 384 孔板第 Y 排, 每一个奇数列 (1,3,5...21) 的孔里添加 12 μ l 激酶溶液, 向孔 Y23 中添加 8 μ l 激酶溶液。这一排就是您的 待用激酶排。
8. 激酶反应实验: 从第 Y 排, 待用激酶排 的每个样品孔内, 移取 2 μ l 激酶样品 (每个样品 4 个重复) 到一个 384 孔检测板 (白色不透光平板) A/B 两排的 A1-A24 及 B1-B22 (孔 Y1 到孔 A1/A2/B1/B2, 以此类推, 最终孔 Y23 到 A23/A24)。
注意: 孔 B23-B24 中仅添加 2 μ l 1X Kinase Buffer, 这两孔为 no-enzyme control (无激酶对照)。
9. 从之前准备好的待用抑制剂滴定排 中每个样品孔, 移取 1 μ l 抑制剂样品 (每个样品两个重复) 到 384 孔检测板对应的检测孔中 (96 孔板的孔 A1 的抑制剂样品加入 384 孔检测板的孔 A1/A2, 以此类推)。
10. 混匀上述 384 孔检测板, 并室温孵育 10 分钟。
11. 从第 X 排, 待用 ATP/Substrate 排 的每个样品孔, 移取 2 μ l 2.5X ATP/Substrate Mix 到 384 孔检测板对应的含样品 (kinase/inhibitor mix) 的孔中 (孔 X1 中样品添加到孔 A1/A2/B1/B2, 以此类推)。
12. 离心上述 384 孔检测板。用微孔板震荡仪混匀 2 分钟。在室温下反应 60 分钟, 或其他期望的时间。

13. 用 **ADP-Glo™ Kinase Assay** 检测 **ADP**: 激酶反应孵育完成后, 在所有待检测孔中加入 5 μ l ADP-Glo™ Reagent。混匀 2 分钟, 室温孵育 40 分钟。
14. 在上述所有待测孔中加入 10 μ l Kinase Detection Reagent。混匀 2 分钟, 室温孵育 30-60 分钟。
15. 测量发光信号 (整合时间 0.5 秒)。
16. **计算激酶的百分比活性**: 首先从每个样品的信号中减去阴性对照的信号 (无酶且无 Staurosporine 组)。然后用 0% 的激酶活性组 (既不含化合物也不含酶) 和 100% 的激酶活性组 (含激酶不含化合物) 各自的复孔 RLU 均值来计算在不同稀释度 Staurosporine 实验组的剩余的百分比酶活性。

注意: 本方案中描述的各种试剂保存板/待用试剂排及检测板的布置建议, 是为方便多通道加样器的使用而设计的, 您可以参考本方案的建议, 也可以按照实际的实验情况准备各种试剂和安排检测样品的排布。试剂准备和激酶反应可以在同一块 384 孔板或不同的 384 孔板, 只要确保进行 ADP-Glo™ Kinase Assay 检测的样品孔一定设置在白色不透光的平板即可。

4. 一般注意事项

发光信号 (Luminescence): ADP-Glo™ Kinase Assay 产生的发光信号是以相对光单位 (Relative Light Units, RLU) 来记录。相对光单位是仪器收集到样品中的发光信号后, 通过计算得到的一个相对光强度, 不同的仪器使用不同的算法和感光元件, 因此, 原始的 RLU 数值在不同的仪器间会相差颇多, 即便使用相同的实验模型, 也不能直接进行比较。以 ADP-Glo™ Kinase Assay 而论, 使用的检测仪器的不同, 同一激酶测定产生的 RLU 就可能有很大的差别。因此, 使用任何特定的激酶系统生成的 RLU 将与该激酶对应的应用说明 (Application Note) 中显示的 RLU 不同。应用说明的链接可以在每个激酶产品的页面上找到: www.promega.com/products/cell-signaling/kinase-assays-and-kinase-biology/。

信号背景比 (Signal to Background (SB) ratio) : SB 值的大小取决于所研究的激酶, 酶产生的 SB 值取决于其活性。因此, Promega 提供的激酶系统 (Kinase Enzyme Systems) 的每种激酶会依据其特定活性产生不同的 SB。此外, 激酶通常对冻融循环和高温下长时间放置非常敏感。为了防止激酶活性下降, 激酶应当被妥善分装保存, 并且一旦从冰箱中取出应立即操作和处理。

低酶活性 (Low enzyme activity) : 一些激酶本身具有较低的比活性 (low specific activity)。因此在进行分析时需要用大量的酶来进行反应。为了增加总 ADP 的产生, 同时使用尽量少的酶, 我们建议将孵育时间适当延长, 和/或同时提高激酶反应温度到 30-37°C (在进行 ADP-Glo™ Kinase Assay 前, 需将激酶反应平衡到室温, 在室温条件下进行后续的试剂孵育过程)。

不依赖底物的激酶活性 (Substrate-independent kinase activity) : 在体外, 一些激酶具有固有的内在 ATP 酶活性, 这意味着在缺乏底物的情况下, 激酶会磷酸化水 (水解) 并释放 ADP。这取决于使用的激酶的特性, 这种活性可以在没有底物的情况下检测出来。所有的以 Kinase Enzyme System 形式购买到的激酶, 都已进行过测试, 通过用 Staurosporine 或激酶特异性抑制剂完全地抑制其活性, 表明其中不具有外源性 ATP 酶活性。此外, 如果一种激酶具有 ATP 酶活性, 那么这种活性是可抑制的。而且, 在无底物与有底物实验产生的 IC₅₀ 相似。

产品资料：对于使用 KES 系统的研究者，除了本操作指南，以及 ADP-Glo™ Kinase Assay 技术手册 #TM313 或 ADP-Glo™ Max Assay 技术手册 #TM343，还可以在 Promega 官网上获取以下专有的产品资料：

- **CoA (Certificates of Analysis) :** <https://www.promega.com.cn/resources/certificates-of-analysis/> (使用仅包含激酶系统的目录号进行检索，不要使用 KES+ ADP-Glo 对应的目录号)。CoA 文件中包括激酶产品的批次特异性活性，储存建议，详细的组分列表，以及激酶的表达方式、序列信息等。激酶的批次特异性活性可以帮助使用者在每次收到新产品后灵活的决定是否调整反应中激酶的用量。

Certificate of Analysis

KDR Kinase Enzyme System

Human recombinant KDR expressed in Sf9 insect cells

Promega Catalog # V2681

Product Description
Human recombinant KDR was expressed by baculovirus in Sf9 insect cells using an N-terminal GST tag. The gene accession number is NM_002253. The peptide substrate Poly (Glu₄Tyr₁) is also included in the system. For complete list of system components, see Components section.

SignalChem Part #	Component	Size
K01-11G-10	KDR, Active (0.1µg/µl)	10 µg
P61-58	Poly (Glu ₄ Tyr ₁) (1mg/ml)	1 ml
K03-09	5x Reaction Buffer A	1.5 ml
D86-098	DTT (0.1M)	25 µL

Storage
For optimal storage, aliquot the kinase upon receipt into smaller quantities after centrifugation and store at recommended temperature. After first use, store the remaining kinase at -70°C and the rest of the components at -20°C.

Stability and Shipping
For most favorable performance, avoid multiple freeze/thaw cycles. If stored properly at the recommended temperature, the stability of the Kinase Enzyme System is 1 year from date of shipment. Product shipped on dry ice.

Instructions for Use
For details on the specific activity of the kinase or kinase activity determination protocol, please go to the website: <http://www.promega.com/lbs/signaling.htm> to view the lot specific data sheet (Enzyme Lot # is located on the product information label).

Signed by: *J. Yuan*
SignalChem QA, Quality Assurance Manager

For in vitro Research Use Only. Not Intended for Use in Humans or Animals

KDR Kinase Enzyme System

Catalogue #: V2681

System Lot #: 0000540183

SignalChem Kinase Lot #: I3229-8

Specific Activity: 273 nmol/min/mg

Storage Temp: -70°C

For in vitro Research Use Only

Made in Canada

Application
The ADP-Glo™ Kinase Assay can be used to measure the activity of KDR by quantifying the amount of ADP produced during a kinase reaction. The following is only a short protocol. For more detailed and complete protocols, see the ADP-Glo™ Kinase Assay technical Manual #TM313 and the active kinase datasheet available at: <http://www.promega.com/lbs/tm313/tm313.htm> and <http://www.promega.com/lbs/signaling.htm>, respectively.

Kinase Reaction:

- In 384-well low volume plate (5µl total reaction volume) or 96-well plate (25µl total reaction volume), perform kinase reaction using 1x Reaction buffer A supplemented with 5mM DTT and containing the following:
 - Kinase (desired amount)
 - 1µg Poly (Glu₄Tyr₁) peptide
 - 50µM ATP (final concentration)
 - Inhibitor (DMSO for control)
- Incubate at room temperature for 30-60 minutes or any desired time.

ADP-Glo™ Kinase Assay:

- Add 5 µl of ADP-Glo™ Reagent
- Incubate at room temperature for 40 minutes.
- Add 1 µl of Kinase Detection Reagent
- Incubate at room temperature for 30-60 minutes.
- Record luminescence (Integration time 0.5-1 second).

For a detailed list of applications, see ADP-Glo™ Applications Database at: <http://www.promega.com/applications/cell-signaling/cellsignaling.htm>

Kinase Enzyme System Manufactured By

SignalChem
Specialists in Signaling Proteins

Exclusively Distributed By

Promega

Promega Corporation
2600 Woods Hollow Road
Madison WI 53711 USA
Telephone: 608-274-4300
Toll-free: 800-368-9696
Fax: 608-277-2516
Internet: www.promega.com

KDR Kinase Enzyme System

Catalogue #: V2681

System Lot #: 0000540183

SignalChem Kinase Lot #: I3229-8

Specific Activity: 273 nmol/min/mg

Storage Temp: -70°C

For in vitro Research Use Only

Made in Canada

Product Description
Human recombinant KDR was expressed by baculovirus in Sf9 insect cells using an N-terminal GST tag. The gene accession number is NM_002253. The peptide substrate Poly (Glu₄Tyr₁) is also included in the system. For complete list of system components, see Components section.

组分列表

Storage
For optimal storage, aliquot the kinase upon receipt into smaller quantities after centrifugation and store at recommended temperature. After first use, store the remaining kinase at -70°C and the rest of the components at -20°C.

- **应用说明 (Application Note)** : 应用说明的链接可以在每个激酶产品的页面上找到 : www.promega.com/products/cell-signaling/kinase-assays-and-kinase-biology/ 。这份说明可以帮助使用者快速建立激酶实验的基础条件。

在这份说明的第二页底部, 会提供已验证过的对应激酶的 1xKinase buffer 的组成信息, 方便使用者确定如 DTT、MnCl₂ 等辅助因子的最终工作浓度, 以正确配制反应缓冲液。

KES 中的所有激酶被分为八大类, 依据已发表文献中的信息, 我们为每一类激酶选择了与其已发布的 ATP Km 值范围接近的浓度来进行激酶滴定和抑制剂滴定实验 (因为太多的激酶, 我们不会针对每一种激酶进行全面的条件优化)。相关的示例结果及反应条件, 以及该浓度下的 ATP 到 ADP 转化曲线结果, 均发布在对应激酶的 Application note 中 (如下图所示)。对于希望快速开始实验的使用者, 我们建议您按照 Application Note 中描述的 ATP 浓度, 底物浓度, 反应温度及时间来进行操作。当然, 您也可以自行优化所有条件来达到最优的反应性能, 相关建议可以查阅 ADP-Glo™ Kinase Assay 技术手册 #TM313 或 ADP-Glo™ Max Assay 技术手册 #TM343。

如本操作手册第 3 章节所述, 我们建议您每次收到一份新的 KES 时, 为了确定后续用于抑制剂的剂量 - 反应曲线测定的最佳酶用量, 首先进行激酶滴定。对于第一次使用的激酶, 建议您参照对应的应用说明示例, 进行完整的激酶滴定曲线的测定。如果是已使用过的激酶, 只是不同批次, 您可以参照 CoA 文件上的批次特异性活性参数, 进行小范围的滴定, 以确定批次特异的 SB₁₀。我们不建议您直接使用应用说明上的 SB₁₀ 进行后续实验, 因为不同批次酶的活力会有差异, 而您实际的操作、反应条件、检测耗材、检测仪器, 都会影响 SB₁₀ 的实际结果。请务必为每一批激酶进行滴定优化, 以便使用最佳酶用量进行后续实验。应用说明中列举的 Staurosporine 或其他激酶特异性抑制剂量效曲线可以用作阳性对照, 用于确定实际的实验流程是否正确。

ATP 到 ADP 转化曲线可以用于计算每个酶用量产生的 ADP 转化百分比, 也可以用于评估 ADP-Glo™ Kinase Assay 性能。对于首次接触的使用者, 或者新建立一种激酶检测的使用者, 我们建议您生成转化曲线, 以评估整个实验流程是否正确运行。如果之后的实验不需要定量 ADP 的转化, 则不需要每次实验生成转化曲线。当实验结果出现异常时, 如背景信号高、信号变异大、化合物效果与预期不符等等, 可以通过转化曲线进行疑难排查, 来判断出现异常的原因。



KDR Kinase Assay

By Dongping Ma, M.S., Hicham Zegzouti, Ph.D., Jolanta Vidugriene, Ph.D., and Said A. Goueli, Ph.D., Promega Corporation

Scientific Background:

KDR (or kinase insert domain receptor) is a growth factor receptor tyrosine kinase that was originally isolated from human endothelial cells where it plays a pivotal role in endothelial cell proliferation and differentiation. KDR and its mouse homolog Flk1 bind VEGF with high affinity and are implicated in the development of new blood vessels (angiogenesis) (1). The expression levels of VEGF and KDR are highly correlated during the normal development of the ocular vasculature in humans (1). Induction of angiogenesis is a critical step in tumor progression, and inhibitors of KDR have been demonstrated both to induce tumor regression and reduce metastatic potential in preclinical models (2).

1. Neufeld, G. et al: Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. FASEB J. 1999 Jan;13(1):9-22.
2. Zhu, Z. et al: Inhibition of tumor growth and metastasis by targeting tumor-associated angiogenesis with antagonists to the receptors of vascular endothelial growth factor. Invest New Drugs. 1999;17(3):195-212.

ADP-Glo™ Kinase Assay

Description

ADP-Glo™ Kinase Assay is a luminescent kinase assay that measures ADP formed from a kinase reaction: ADP is converted into ATP, which is converted into light by Ultra-Glo™ Luciferase (Fig. 1). The luminescent signal positively correlates with ADP amount (Fig. 2) and kinase activity (Fig. 3A). The assay is well suited for measuring the effects chemical compounds have on the activity of a broad range of purified kinases—making it ideal for both primary screening as well as kinase selectivity profiling (Fig. 3B). The ADP-Glo™ Kinase Assay can be used to monitor the activity of virtually any ADP-generating enzyme (e.g., kinase or ATPase) using up to 1mM ATP.

Promega Corporation • 2800 Woods Hollow Road • Madison, WI 53711-5399 USA • Telephone 608-274-4330 • Fax 608-277-2601

promega.com

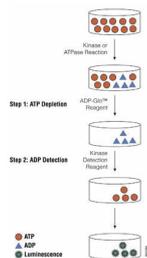


Figure 1. Principle of the ADP-Glo™ Kinase Assay. The ATP remaining after completion of the kinase reaction is depleted prior to an ADP to ATP conversion step and quantitation of the newly synthesized ATP using luciferase/luciferin reaction.

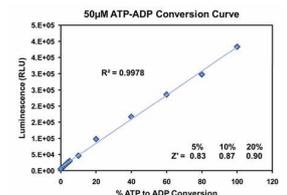


Figure 2. Linearity of the ADP-Glo™ Kinase Assay. ATP-to-ADP conversion curve was prepared at 50µM ATP+ADP concentration range. This standard curve is used to calculate the amount of ADP formed in the kinase reaction. Z' factors were determined using 192 replicates of each of the % conversions shown.



For detailed protocols on conversion curves, kinase assays and inhibitor screening, see The ADP-Glo™ Kinase Assay Technical Manual #TM313, available at www.promega.com/tbs/tm313/tm313.html

Protocol

- Dilute enzyme, substrate, ATP and inhibitors in Kinase Buffer.
- Add to the wells of 384 low volume plate: 1 µl of inhibitor or (5% DMSO) 2 µl of enzyme (defined from table 1) 2 µl of substrate/ATP mix
- Incubate at room temperature for 60 minutes.
- Add 5 µl of ADP-Glo™ Reagent
- Incubate at room temperature for 40 minutes.
- Add 10 µl of Kinase Detection Reagent
- Incubate at room temperature for 30 minutes.
- Record luminescence (Integration time 0.5-1second).

Table 1. KDR Enzyme Titration. Data are shown as relative light units (RLU) that directly correlate to the amount of ADP produced. The correlation between the % of ATP converted to ADP and corresponding signal to background ratio is indicated for each kinase amount.

KDR, ng	100	50	25	12.5	6.3	3.1	1.6	0.8	0.4	0
Luminescence	308871	259683	223129	180955	144962	111758	68264	39483	23327	4673
S/B	66	56	48	39	31	24	15	8	5	1
% Conversion	80	67	57	46	36	27	16	8	3	0

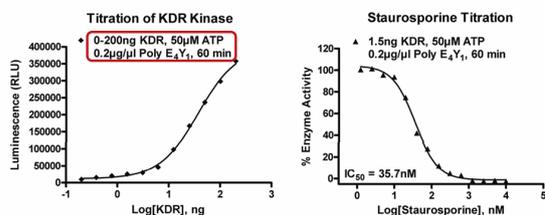


Figure 3. KDR Kinase Assay Development: (A) KDR enzyme was titrated using 50µM ATP and the luminescence signal generated from each of the amounts of the enzyme is shown. (B) Staurosporine dose response was created using 1.5ng of KDR to determine the potency of the inhibitor (IC₅₀).

Products	Company	Cat.#
ADP-Glo™ Kinase Assay	Promega	V9101
KDR Kinase Enzyme System	Promega	V2681
ADP-Glo + KDR Kinase Enzyme System	Promega	V9471

KDR Kinase Buffer: 40mM Tris, 7.5, 20mM MgCl₂, 0.1mg/ml BSA, 50µM DTT

Promega Corporation • 2800 Woods Hollow Road • Madison, WI 53711-5399 USA • Telephone 608-274-4330 • Fax 608-277-2601

promega.com

5. 参考文献

1. Tai, A.W. *et al.* (2011) A homogeneous and nonisotopic assay for phosphatidylinositol 4-kinases. *Anal. Biochem.* **417**, 97–102.
2. Zegzouti, H. *et al.* (2009) ADP-Glo: A bioluminescent and homogeneous ADP monitoring assay for kinases. *Assay Drug Dev. Technol.* **7(6)**, 560–72.
3. Vidugiriene, J. *et al.* (2009) Evaluating the utility of a bioluminescent ADP-detecting assay for lipid kinases. *Assay Drug Dev. Technol.* **7(6)**, 585–97.
4. Zegzouti, H. *et al.* (2011) Screening and profiling kinase inhibitors with a luminescent ADP detection platform. www.promega.com/resources/pubhub/screening-and-profiling-kinase-inhibitors-with-a-luminescent-adp-detection-platform.
5. ADP-Glo™ Kinase Assay Technical Manual #TM313, Promega Corporation.
6. ADP-Glo™ Max Assay Technical Manual #TM343, Promega Corporation.

6. 修订总结

英文原版操作手册在 2022/04 修订版中做了如下修改：

1. 相比上一版本，修订了 Section 3.B, 第一步中 DMSO 的浓度为 5%。
2. 修正了一些笔误。
3. 更新了封面。

© 2018–2019 Promega Corporation. All Rights Reserved. ADP-Glo is a trademark of Promega Corporation.

Multidrop is a registered trademark of Thermo Fisher Scientific.

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.