

中文说明书

ADP-Glo™ 脂激酶系统

适用产品目录号：

V1721, V1731, V1741, V1751, V1761, V1771, V1711, V1701,
V1781, V1782, V1791, V1792, V1691 和 V1690



ADP-Glo™ 脂激酶系统

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. 描述	1
2. 产品组分和储存条件.....	5
3. 开始前准备.....	7
3. A. 准备 ADP-Glo™ 检测所需试剂	8
3. B. 准备脂激酶底物	9
3. C. 为 ATP 到 ADP 的转化生成标准曲线	9
4. 操作方案	12
4. A. 优化酶浓度.....	12
4. B. 抑制剂滴定	14
5. 一般注意事项	15
6. 参考文献	16
7. 附录	16
7. A. 磷酸肌醇脂激酶的分类.....	16
7. B. 测定 K_m 值	18
7. C. 计算激酶的比活性 (Specific Activity)	20
8. 相关产品	22
9. 修订总结	23

1. 产品描述

磷脂酰肌醇 (Phosphatidylinositol, PI) 及其磷酸化衍生物，统称为磷酸肌醇，是重要的第二信使，作为信号分子和对细胞膜重塑都至关重要 (1,2)。这些衍生物是由磷酸肌醇脂激酶 (phosphoinositide lipid kinases, PIKs; 图 1) 家族产生的。哺乳动物中已鉴定出 19 种 PIK 亚型。根据它们优先磷酸化肌醇环 3、4 或 5 位羟基的能力，它们被大致分为三大家族：磷酸肌醇 3- 激酶 (PI3Ks)、磷酸肌醇 4- 激酶 (PI4Ks) 和磷酸肌醇磷酸激酶 (PIP5Ks 和 PIP4Ks ; 图 1 及 7.A 部分; 3)。

ADP-Glo™ 脂激酶系统提供一整套的试剂，可进行磷酸肌醇脂激酶 (PIK) 反应，并使用发光法 ADP 检测平台 ADP-Glo™ Kinase Assay^(a,b,c) 进行检测。这个系统包含纯化的重组 I 类 PI3Ks 蛋白，优化的反应缓冲液，和即用型的脂激酶底物。

2. 产品描述（接上页）

脂质底物以冷冻的小单层囊泡形式提供，其中含有磷脂酰肌醇（PI）或磷酸肌醇-4, 5-二磷酸（PIP₂），以及作为载体脂质的磷脂酰丝氨酸（PS）。PI 或 PIP₂ 与 PS 以 1:3 比例混合。PIP₂ 与 PS 以 1 : 3 比例组成的底物已被优化用于 I 类 PI3Ks (4)。由 PI 和 PS 以 1:3 的比例组成的底物被大多数家族成员所识别，是通用的 PI 脂激酶底物 (5,6)。

ADP-Glo™ 脂激酶检测的原理和整体检测流程如图 2 和图 3 所示。通过将脂质底物（PI:3PS 或 PIP₂:3PS）、重组酶以及 ATP 共同孵育来进行脂激酶反应，然后使用 ADP-Glo™ Kinase Assay 来检测激酶活性。ADP-Glo™ Kinase Assay 以两个步骤来实现。在激酶反应结束后，第一步，加入一种 ATP 消耗试剂，这一步骤会终止脂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），只留下 ADP。第二步，加入一种检测试剂，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 通过偶联的萤光素酶 / 萤光素反应被转化为光信号（图 2 和图 3）。

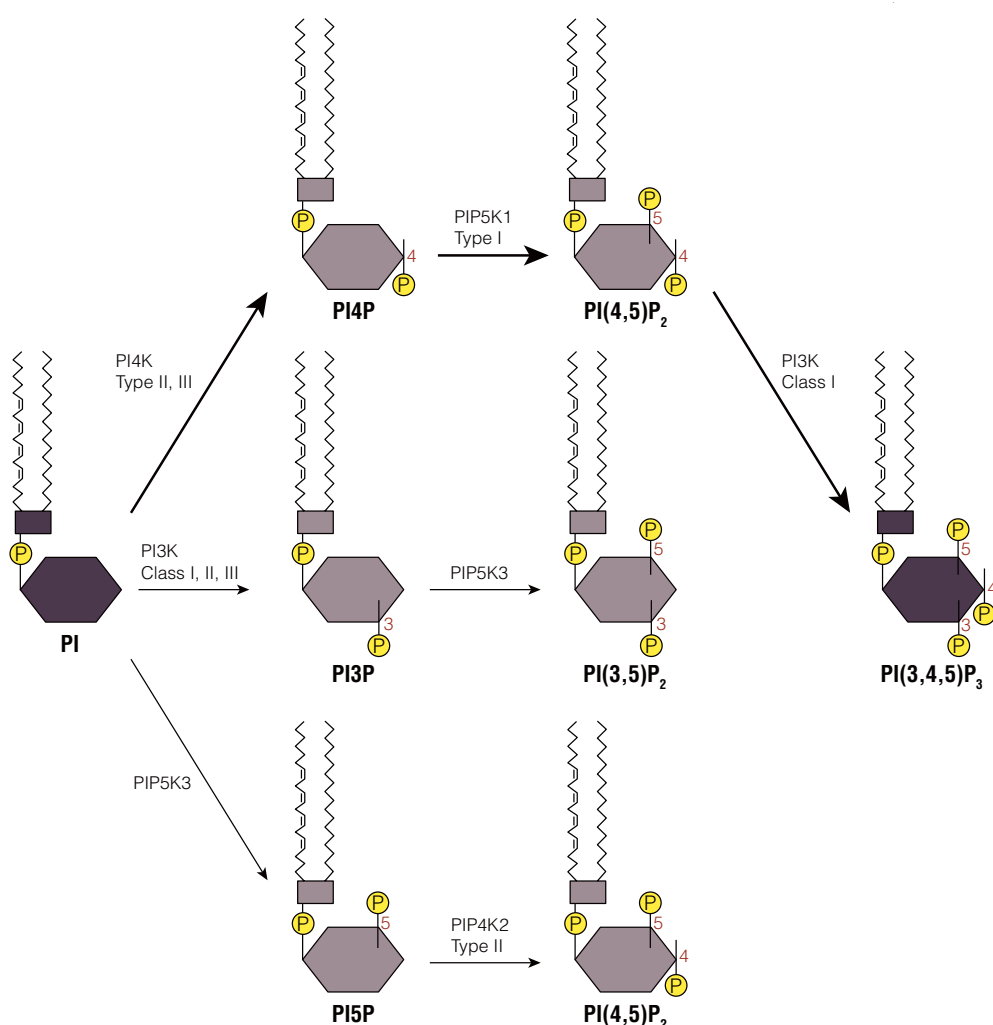


图 1. 磷酸肌醇脂激酶催化的体外反应。

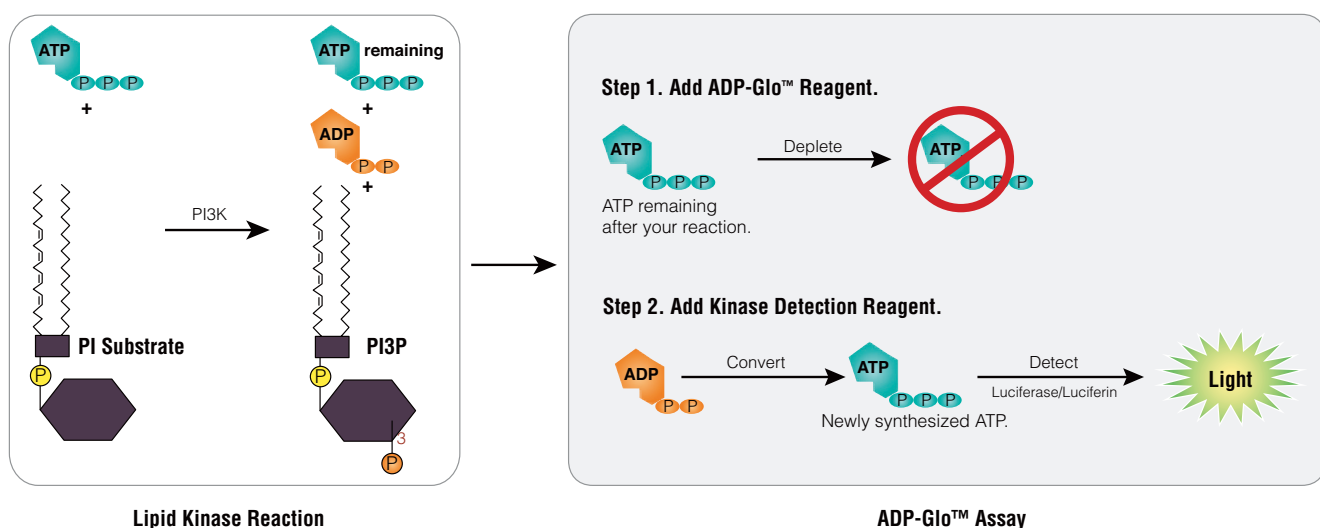


图 2. ADP-Glo™ 脂激酶检测的原理。 在合适的底物和 ATP 的存在下进行脂激酶反应。然后用 ADP-Glo™ Assay 以两步操作来检测激酶的活性。第一步，添加 ADP-Glo™ Reagent 终止脂激酶反应并耗尽体系中剩余的 ATP，只留下 ADP。然后添加 Kinase Detection Reagent，将 ADP 转化为新的 ATP，同时使得新合成的 ATP 被偶联的萤光素酶 / 萤光素反应利用产生发光。最终产出的发光信号被测量，其与激酶活性正相关。

ADP-Glo™ 脂激酶检测系统提供了一种便捷灵敏的方法来测量所有类型的磷酸肌醇脂激酶 (PIKs) 活性。该方法可在 96 孔板或 384 孔板中进行，可用于酶学表征、抑制剂筛选或化合物分析。

检测系统优势

- **特点：**均质、稳健且非放射性的检测方法。
- **灵活：**脂激酶与蛋白激酶采用同一种检测模式且具有广泛的 ATP 浓度线性范围。
- **正信号输出：**检测信号随产物生成的增加而线性增加。
- **大动态范围：**在较低的 ATP 转化为 ADP 百分比情况下具有高信号背景比率，容许使用更小剂量的激酶进行反应。

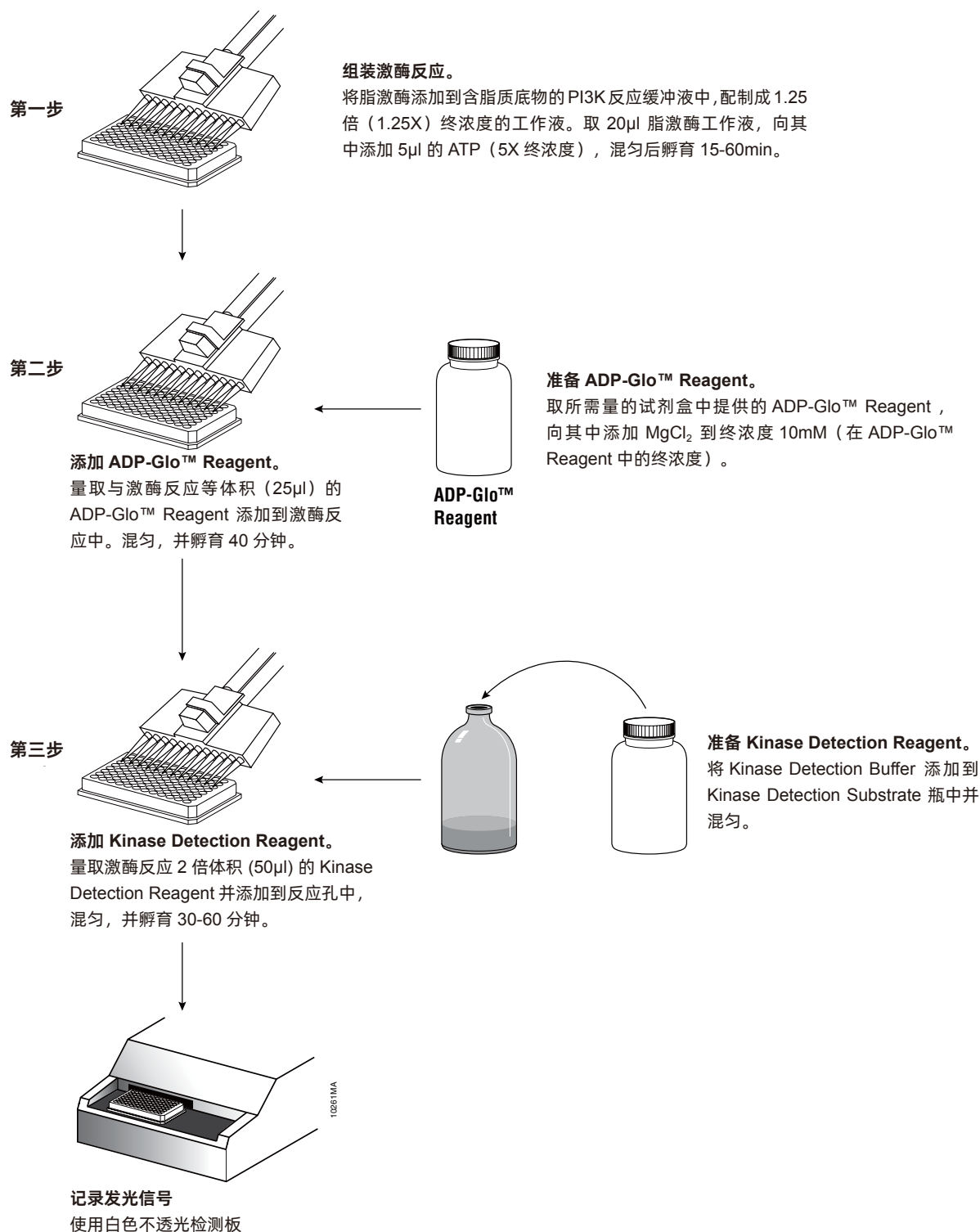


图 3. ADP-Glo™ 脂激酶检测方案示意图。

2. 产品组分和储存条件

激酶

产品	规格	目录号
PI3K (p110 α /p85 α), 20 μ g	200 μ l	V1721
PI3K (p110 α [E545K]/p85 α), 20 μ g	200 μ l	V1731
PI3K (p110 α [H1047R]/p85 α), 20 μ g	200 μ l	V1741
PI3K (p110 β /p85 α), 20 μ g	200 μ l	V1751
PI3K (p120 γ), 20 μ g	200 μ l	V1761
PI3K (p110 δ /p85 α), 20 μ g	200 μ l	V1771

每一个重组酶随附 1ml 5X PI3K Reaction Buffer。

脂质底物

产品	规格	目录号
PI:3PS Lipid Kinase Substrate, 0.5mg	0.5ml	V1711
PIP2:3PS Lipid Kinase Substrate, 0.25mg	0.25ml	V1701

V1711 与 V1701 都随附 1ml 10X Lipid Dilution Buffer 和 1ml 1M MgCl₂。试剂盒中提供足够的底物：如果在 384 孔 LV 板中进行 5 μ l 激酶反应，可进行 1000 次测定；如果在 96 孔板中进行 25 μ l 激酶反应，可进行 200 次测定。

PI 激酶检测系统

产品	规格	目录号
ADP-Glo™ Kinase Assay with PI:3PS	1,000 assays	V1781

V1781 足够用于：如果在 384 孔 LV 板中进行 5 μ l 激酶反应，可进行 1000 次测定；如果在 96 孔板中进行 25 μ l 激酶反应，可进行 200 次测定。包括：

- 1 套 V1711 PI:3PS Lipid Kinase Substrate, 0.5mg
- 1 套 V9101 ADP-Glo™ Kinase Assay, 1,000 assays

产品	规格	目录号
ADP-Glo™ Kinase Assay with PI:3PS	10,000 assays	V1782

V1782 足够用于：如果在 384 孔 LV 板中进行 5 μ l 激酶反应，可进行 10000 次测定；如果在 96 孔板中进行 25 μ l 激酶反应，可进行 2000 次测定。包括：

- 1 套 V1712 PI:3PS Lipid Kinase Substrate, 5mg
- 1 套 V9102 ADP-Glo™ Kinase Assay, 10,000 assays

2. 产品组分和储存条件 (接上页)

产品	规格	目录号
ADP-Glo™ Kinase Assay with PIP2:3PS	1,000 assays	V1791

V1791 足够用于: 如果在 384 孔 LV 板中进行 5 µl 激酶反应, 可进行 1000 次测定; 如果在 96 孔板中进行 25 µl 激酶反应, 可进行 200 次测定。包括:

- 1 套 V1701 PIP2:3PS Lipid Kinase Substrate, 0.25mg
- 1 套 V9101 ADP-Glo™ Kinase Assay, 1,000 assays

产品	规格	目录号
ADP-Glo™ Kinase Assay with PIP2:3PS	10,000 assays	V1792

V1792 足够用于: 如果在 384 孔 LV 板中进行 5 µl 激酶反应, 可进行 10000 次测定; 如果在 96 孔板中进行 25 µl 激酶反应, 可进行 2000 次测定。包括:

- 1 套 V1702 PIP2:3PS Lipid Kinase Substrate, 2.5mg
- 1 套 V9102 ADP-Glo™ Kinase Assay, 10,000 assays

产品	规格	目录号
PI3K Class I Enzyme System	1 each	V1691

包括:

- 50µl PI3K (p110α/p85α), 5µg
- 50µl PI3K (p110β/p85α), 5µg
- 50µl PI3K (p120γ), 5µg
- 50µl PI3K (p110δ/p85α), 5µg
- 2× 1ml PI3K Reaction Buffer, 5X

产品	规格	目录号
PI3K-Glo™ Class I Profiling Kit	1 each	V1690

V1690 足够用于: 如果在 384 孔 LV 板中进行 5 µl 激酶反应, 可进行 1000 次测定; 如果在 96 孔板中进行 25 µl 激酶反应, 可进行 200 次测定。包括:

- 1 kit V1691 PI3K Class I Enzyme Kit
- 1 kit V1701 PIP2:3PS Lipid Kinase Substrate, 0.25mg
- 1 kit V9101 ADP-Glo™ Kinase Assay, 1,000 assays

储存条件

重组 PI3K 酶：将重组 PI3K 酶保存在 -65°C 以下。第一次使用时，将其快速融化后置于冰上。将任何暂不使用的重组 PI3K 酶分装成一次性使用的小份剂量，并立即将其速冻。避免多次冻融循环。

脂质底物：将脂质底物保存在 -65°C 以下。在使用前，将其在室温融化并完全地平衡至室温。通过涡旋 (vortexing) 充分混匀至少 1 分钟。融化的脂质底物可以在室温 ($+15^{\circ}\text{C}$ 至 $+30^{\circ}\text{C}$) 保存至少 6 个小时，或在 $+2^{\circ}\text{C}$ 至 $+10^{\circ}\text{C}$ 保存一周。

缓冲液：将 5X PI3K Reaction Buffer, 10X Lipid Dilution Buffer 和 1M MgCl_2 保存在 -30°C 至 -10°C 。

ADP-Glo™ Kinase Assay: 收到 ADP-Glo™ Kinase Assay 时，将其中的 ATP 取出并保存在 -65°C 以下。将试剂盒中其余组分全部保存在 -30 至 -10°C 。使用前，将所有组分在室温下完全解冻。解冻后，在使用前将各组分充分混合。因为 ATP 经历冻融循环后天然地容易发生水解，请将其分装成单次使用的小份剂量后，将暂不使用的部分冻存至 -65°C 以下。Kinase Detection Reagent (Kinase Detection Buffer + Substrate) 和 ADP-Glo™ Reagent 首次融化并制备好后，请将其分装成小份剂量并保存于 -30 至 -10°C 。为了方便使用，这两种试剂均可在室温下保存 24h，信号没有显著损失。

3. 开始前准备

脂激酶检测是在 1X PI3K Reaction Buffer 中使用 0.1mg/ml 的 PI:3PS 或 0.05mg/ml 的 PIP2:3PS 脂质底物在 25 μM ATP 条件下进行的。该方法也可与其他 ATP 浓度以类似的方式进行。

若使用其他缓冲液或脂质底物，则需确定其与 ADP-Glo™ 检测系统的兼容性。有关 ADP-Glo™ Kinase Assay 的更多信息，请参见 *ADP-Glo™ Kinase Assay Technical Manual #TM313*，可通过以下链接获取：www.promega.com/protocols/

用户需提供的材料

- 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
- 涡旋混合器

3.A. 准备 ADP-Glo™ 检测所需试剂

制备 ADP-Glo™ Reagent

1. 使用前将 ADP-Glo™ Reagent 平衡到室温。
2. 移取当次实验所需体积的 ADP-Glo™ Reagent 到新的容器中。
3. 向其中添加 MgCl_2 ，至终浓度为 10mM。
4. 此制备好的试剂可以在室温稳定保存 24 小时。
5. 将剩余未使用的 ADP-Glo™ Reagent 分装成小份剂量，保存于 -30 至 -10°C 。

制备 Kinase Detection Reagent

1. 在使用前，将 Kinase Detection Buffer 与 Kinase Detection Substrate 平衡至室温。
2. 将一整瓶 Kinase Detection Buffer 全部转移到盛放 Kinase Detection Substrate 的棕色瓶中，以重悬其中的冻干粉底物。这一操作将制成 Kinase Detection Reagent。
3. 通过涡旋、打圈晃动、或颠倒来混匀内容物，以得到均质的溶液。
4. 制备好的 Kinase Detection Reagent 应当在 24 小时内使用，或分装成小份剂量并保存在 -30 至 -10°C 。重悬的试剂在经受几次冻融循环后仍能保持稳定，没有信号损失。

制备 2.5X PI3K Reaction Buffer

1. 在使用前，将 5X PI3K Reaction Buffer 平衡至室温。
2. 移取当次实验所需体积的 5X PI3K Reaction Buffer 到新的容器中。
3. 向其中添加等体积的 ddH_2O 。

3.B. 准备脂激酶底物

PI:3PS 和 PIP2:3PS 这两种脂激酶底物被开发用于 ADP-Glo™ Lipid Kinase Assays。

PI:3PS 脂激酶底物由 1mg 磷脂酰肌醇 (PI) 和作为载体磷脂加入的 3mg 磷脂酰丝氨酸 (PS) 共同构成。PI:3PS 是 PI3K 和 PI4K 家族所有成员的通用底物。推荐的激酶反应中的 PI:3PS 终浓度为 0.1mg/ml。

PIP2:3PS 脂激酶底物由 1mg 磷酸肌醇 - 4,5 - 二磷酸 (PIP2) 与 3mg PS 共同构成。PIP2:3PS 是 I 型 PI3Ks 的选择性底物。推荐的激酶反应中的 PIP2: 3PS 终浓度为 0.05mg/ml。

! 注意：在加入激酶反应之前，脂质底物应在 2.5 X Lipid Dilution Buffer 中配制成 2.5X 终浓度。浓度计算是基于 PI 或 PIP2 的浓度。不要将脂质底物直接稀释到 PI3K Reaction Buffer 中，因为脂质囊泡在该缓冲液中不稳定并会开始沉淀。配制 1ml 2.5X 脂质底物工作液。

1. 融化 PI:3PS 或 PIP2:3PS 储备液，并将其平衡至室温。
2. 通过充分涡旋 (vortexing) 至少 1 分钟来混匀融化了的脂质底物。
3. 将 250μl PI:3PS 储备液，或 125μl PIP2:3PS 储备液，添加到 250μl 10X Lipid Dilution Buffer 中。
4. 加水至总体积达到 1ml。
5. 通过充分涡旋至少 1 分钟来完全地混匀上述溶液。

注意：脂质底物在每次使用前都应当完全混匀。

! 3.C. 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，并确保脂激酶反应是在底物向产物转化的初始速率 (一般为转化率 5 - 10 % 时) 下进行，需要绘制 ATP 到 ADP 的转化曲线。转化曲线也将指示检测试剂的性能，并有助于仪器优化。

在激酶反应所需的 ATP 和底物浓度下进行 ATP 到 ADP 转化曲线的制作。以下提供了使用 0.05mg/ml 的 PIP2: 3PS 底物在 25μM ATP 浓度下为 ADP-Glo™ Lipid Kinase Assay 建立 ATP 到 ADP 转化曲线的配制方法。以 40% 的 ATP 转化为 ADP 为起始点的标准曲线见图 4。

3.C. 为 ATP 到 ADP 的转化生成标准曲线 (接上页)

操作方案

第一部分：按照激酶反应中使用的 ATP 浓度制备 5X ATP 浓度对应的 ATP + ADP 稀释液母液板。举例来说，如果在 25 μ M ATP 下进行脂激酶反应，则应当如表 1 所示制备 125 μ M 系列 ATP + ADP 标准品。

表 1. 制备 125 μ M ATP 对应的 ATP + ADP 稀释液母液板概述

孔编号	A1	A2	A3	A4	A5	A6
ATP 到 ADP 的百分比转化率	40% ADP + 60% ATP	20% ADP + 80% ATP	10% ADP + 90% ATP	5% ADP + 95% ATP	2.5% ADP + 97.5% ATP	no ADP + 100% ATP
125 μ M ADP (μ l)	40	20	10	5	2.5	0
125 μ M ATP (μ l)	60	80	90	95	97.5	100

1. 取适量试剂盒中提供的 Ultra Pure ATP 和 ADP，用水稀释，制备成 600 μ l 的 125 μ M ATP 和 600 μ l 的 125 μ M ADP。
注意：只能使用试剂盒中提供的 Ultra Pure ATP。其他来源的 ATP 可能含有较多 ADP，会导致背景信号较高。
2. 将上一步骤中准备的 125 μ M ATP 和 ADP 溶液按表 1 所示的方案添加到 A1 ~ A6 孔中，以模拟每个百分比的生成物 (ADP) 形成时的 ATP 和 ADP 浓度。
3. 混合均匀。

第二部分：组装 ATP+ADP 转化曲线板 (示例使用 96 孔板规格)。在转化曲线样品中使用将用在激酶反应中的脂质底物。在提供的示例中，我们使用 PIP2:3PS 脂质底物。

1. 取一块新的孔板作为 ATP+ADP 转化曲线检测板 (此时应使用白色不透光平板)。向检测板的孔 A1–A6 中均添加 10 μ l 2.5X PI3K Reaction Buffer, 10 μ l 2.5X PIP2:3PS 工作液 (在第 3.B 节制备)。
注意：可将 2.5X PI3K Reaction Buffer 和 2.5X PIP2:3PS Lipid Substrates 混合在一起，然后向每个孔中加入 20 μ l 的混合液。
2. 从母液板 (按照表 1 制备) 的各个孔中移取 5 μ l ATP + ADP 稀释液母液，添加到检测板上对应的孔中 (即 A1 到 A1, A2 到 A2, 以此类推)。至此，制备得到了 25 μ M ATP +ADP 转化曲线样品。
注意：更好的做法是，转化曲线样品应有三个重复孔，并且与激酶反应在同一块检测板上平行进行。

第三部分：按照第 4.A 节 ADP-Glo™ Lipid Kinase Assay 操作方法的第 7 步及后续步骤继续操作。

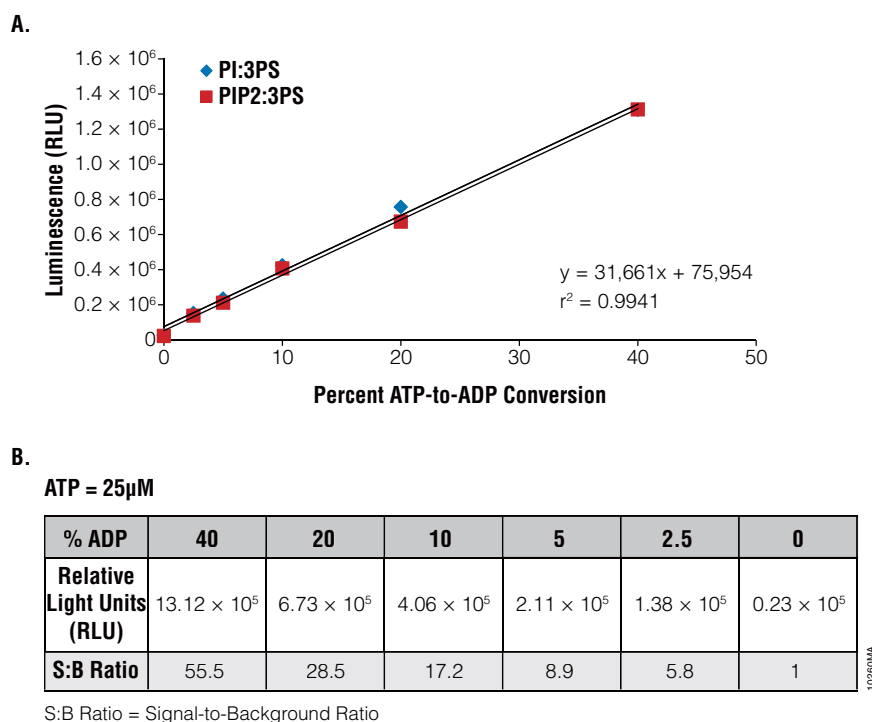


图 4. 25 μ M ATP 的标准 ATP 到 ADP 转化曲线示例。 ATP 到 ADP 转化曲线的制作如第 3.C 节所述。该检测在白色不透光 96 孔板中进行。使用 GloMax[®] 96 Microplate Luminometer 记录发光。数值代表了四次重复的均值。虽然不同发光检测仪读出的绝对值会有所不同，但信背比 (signal-to-background ratio) 并不受影响。**Panel A** 显示了在含 PI:3PS 或 PIP2:3PS 脂质底物的反应缓冲液中的 ADP 的量与发光信号之间的线性关系。**Panel B** 展示了含 PIP2:3PS 底物的条件下不同产物生成比例下对应的原始 RLU (相对光单位) 值和计算得到的信背比。

4. 操作方案

该操作方案是为在 96 孔板中进行 25 μ l 反应提供的。如果使用其他反应体积，请保持酶反应体积与 ADP-Glo™ Reagent 体积与 Kinase Detection Reagent 体积是 1:1:2 的比例。

4.A. 优化酶浓度

为确定最佳酶浓度，在激酶反应所需的 ATP 和脂质底物浓度下设置激酶滴定实验。用于后续化合物筛选和待测化合物 IC₅₀ 测定的最佳脂激酶用量，是在激酶滴定曲线线性范围内产生发光且底物转化为产物的量小于 10 % 的脂激酶量。代表性数据见图 5。

1. 混合等体积的 2.5X PI3K Reaction Buffer 与 2.5X 脂质底物工作液（在第 3.B 节制备）。
2. 直接使用上一步骤中制备的 PI3K Reaction Buffer/Lipid Substrate 混合液对脂激酶进行二倍系列稀释，从 5ng/ μ l 开始。
3. 混合均匀。
4. 将稀释好的激酶每一孔移取 20 μ l 到一个反应板（检测板）中。
5. 使用水稀释试剂盒中提供的 10mM ATP 储备液制备成 125 μ M ATP 工作液。向每一孔中添加 5 μ l 125 μ M ATP 来开始脂激酶反应。
6. 盖上检测板，混匀 30-60 秒（可使用微孔板震荡仪），然后在 23° C（室温）孵育 1 小时。
7. （打开检测板）向其中每个需要检测的孔中添加 25 μ l 在第 3.A 节制备好的 ADP-Glo™ Reagent（含 10mM MgCl₂），来终止酶反应并消耗所有未反应的 ATP。
8. 在 23° C（室温）孵育 40 分钟。
9. 向上述每个孔中添加 50 μ l Kinase Detection Reagent，以将 ADP 转化为新的 ATP，并将新生成的 ATP 引入萤光素酶 / 萤光素反应被检测。
10. 在 23° C（室温）孵育 40 分钟。
11. 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：仪器的参数设置取决于仪器生产厂家。使用每孔 0.25 ~ 1 秒的整合时间为参考标准。ADP-Glo™ Kinase Assay 信号具有长半衰期，容许检测板在读取前在室温放置更长一点的时间。

可选：可以用另一种可替代操作方案来组装激酶反应。举例来说：直接使用 2.5X PI3K Reaction Buffer 对脂激酶进行二倍系列稀释，从 10ng/ μ l 开始。从稀释好的脂激酶中每孔转移 10 μ l 到一个反应板中。将第 3.B 节中制备的 2.5X 脂质底物工作液与用水稀释储备液制备得到的 125 μ M ATP 工作液以 2:1 的比例混合。取 15 μ l 制备好的脂质底物 / ATP 混合液，添加到每一个含稀释激酶样品的孔中，来开始激酶反应。然后执行上述步骤 6 及后续操作。

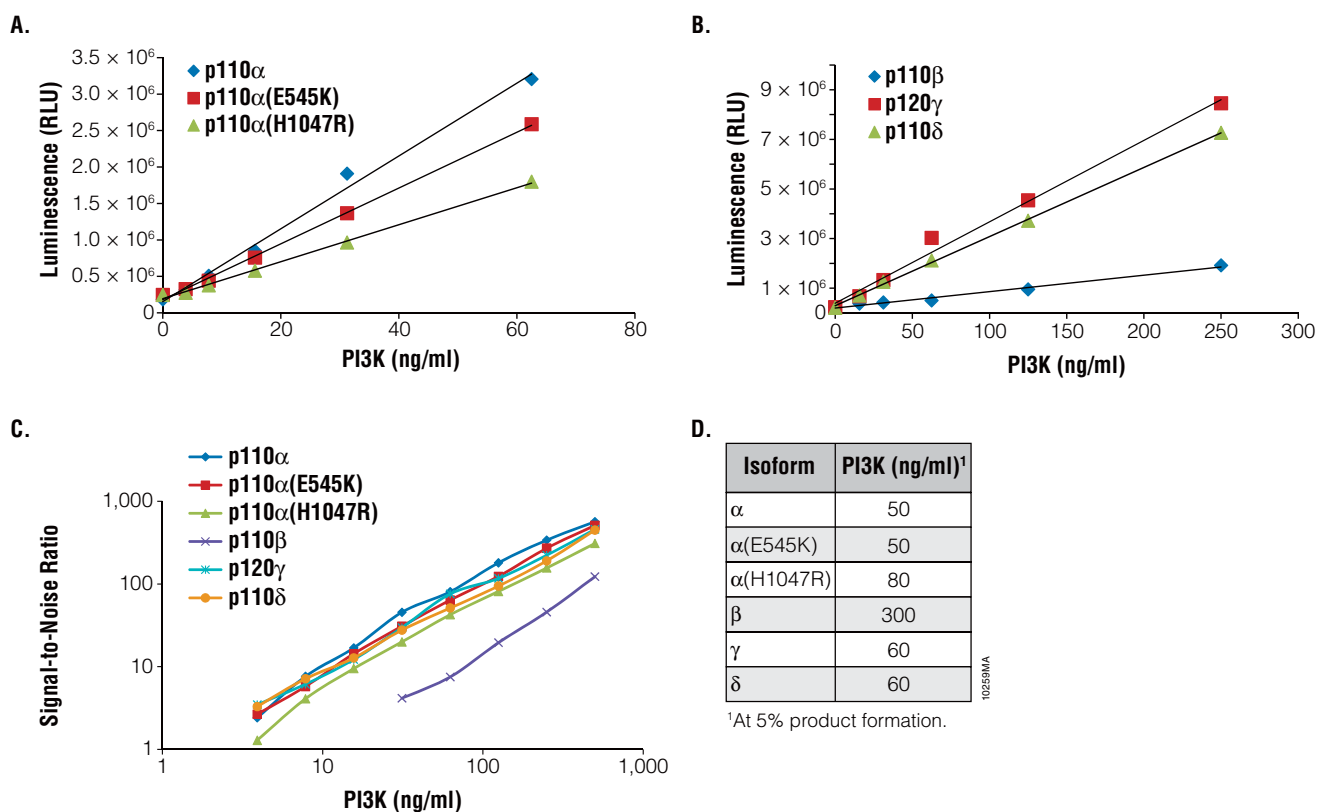


图 5. 脂激酶滴定示例。 脂激酶滴定在白色不透光 96 孔板中进行，使用终浓度为 25 μ M ATP、0.05mg/ml PIP2:3PS 脂质底物在 PI3K kinase reaction buffer 中进行总体积为 25 μ l 的反应，反应在 23 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。**Panels A 与 B** 显示了酶滴定曲线的代表性数据。每个数据点代表四个样本的均值 $\pm$ 标准差。**Panel C** 显示了反应的灵敏度和线性范围。**Panel D** 显示了 5 % 产物形成所需的酶量。由于反应是在初始速率条件下进行的，因此这是设置抑制剂筛选的最佳分析窗口。在此条件下获得了较高的 Z' 因子值 (6、7)。

4.B. 抑制剂滴定

以下操作方案是在激酶反应中进行抑制剂滴定的示例，反应体积为 25 μ l，使用 ATP 终浓度为 25 μ M；实际使用时，可按需调整反应体积和 ATP 浓度。代表性的抑制剂滴定数据请查阅图 6。

1. 制备测试抑制剂的二倍系列稀释液。
2. 转移每个测试抑制剂系列稀释样品 2.5 μ l 到检测板中。
3. 设置 无激酶（背景）与 无测试化合物（最大信号）对照孔。向这些孔中添加 2.5 μ l 测试化合物溶剂。
4. 制备 PI3K Reaction Buffer/Lipid Substrate 混合液：将等体积的 2.5X PI3K Reaction buffer 与 2.5X 脂质底物工作液（在第 3.B 节制备）混合均匀。
5. 使用上一步骤制备的 PI3K Reaction Buffer/Lipid Substrate 混合液稀释脂激酶到所需终浓度的 1.25X。这样就制备好了激酶工作液。
6. 混合均匀。
7. 移取 20 μ l 制备好的激酶工作液到检测板上每一个含测试化合物样品的孔中（包括无测试化合物对照孔，不包括无激酶背景对照孔）。向无激酶背景对照孔中添加 20 μ l 不含激酶的 PI3K Reaction Buffer/Lipid Substrate 混合液（本节第 4 步制备）。
8. 在室温孵育 10–20 分钟使抑制剂与激酶结合。
9. 向每一孔添加 2.5 μ l 250 μ M ATP（用水稀释 10mM 储备液制备得到）来开始激酶反应。
10. 盖上平板并混匀，然后孵育所需的时间（具体时间由使用者自行确立）。
11. 按照第 4.A 节第 7 步及后续步骤进行 ADP-Glo™ Kinase Assay 操作。
12. 记录发光。

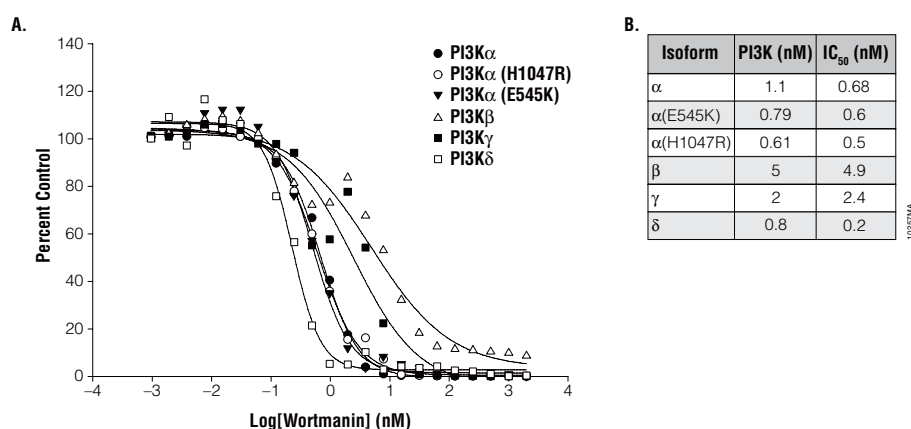


图 6. PI3K 家族抑制剂效价数据示例。 使用第 4.B 节所述操作方案测定已知的 PI3K 抑制剂 wortmannin（渥曼青霉素）的 IC₅₀ 值。从所有组的数据中扣除无激酶背景对照组的读值，抑制百分比为所有检测组相对于无抑制剂组（100% 活力）的相对酶活力。使用 SigmaPlot 9.0 软件提供的 Sigmoidal dose-response(Variable slope) 模型拟合数据，结果展示在 **Panel A**。**Panel B** 展示了反应中使用的酶量和计算得到的对不同 I 型 PI3K 亚型的 IC₅₀ 值。

5. 一般注意事项

检测条件

反应缓冲液：我们建议使用 PI3K reaction buffer (50mM HEPES [pH 7.5], 50mM NaCl, 3mM MgCl₂, 0.025mg/ml BSA) 并在其中加入任何特定激酶可能需要的额外添加剂 (见表 3), 在室温下运行反应 1 小时。如果使用其他反应缓冲液, 需确保当酶反应中加入 ADP-Glo™ Reagent 之后, 整个体系中 MgCl₂ 的浓度至少是 5mM。

脂激酶：在使用脂激酶时, 我们建议避免冻融循环。在制备激酶工作液时, 将脂激酶直接稀释在含有脂质底物的反应缓冲液中。

脂质底物：脂质底物应当先用 Lipid Dilution Buffer (25mM HEPES [pH 7.5], 0.5mM EGTA) 稀释, 然后再与 PI3K Reaction Buffer 混合, 以尽量减少当 Mg²⁺ 浓度 >5mM 时可能出现的脂质沉淀。脂质底物在 Lipid Dilution Buffer 中在室温条件下至少可稳定存放 6 小时, 或可在 2–10°C 稳定存放一周。在添加到激酶反应之前, 应当先将脂质底物平衡到室温并充分混匀。由于脂质的固有特性, 其会与塑料非特异性结合, 因此当处理这些底物时应尽量减少移液操作。

检测板与仪器：我们建议使用适合进行发光检测的标准白色不透光多孔板 (例如, Corning Cat.# 3912, 3674)。检测的结果可使用多种微孔板读数仪来记录; 尽管如此, 读出的相对光强度 (RLU) 数值会因仪器而异。检测孔的几何结构和小分液体积可能会影响混匀的效率, 继而单个孔内的检测均一性差会导致反应噪声增大和 / 或信号降低。一条标准的 ATP 到 ADP 转化曲线可以有助于液体操作与仪器性能的优化。

检测中的对照组

无酶对照：设置三个重复的孔作为无激酶的阴性对照, 其中不含激酶, 用于测定背景发光值。无酶对照组应当与激酶反应组具有相同的条件设置 (相同的反应体积, 缓冲液, 脂质底物和 ATP 浓度)。

无底物对照：设置三个重复的孔作为无底物对照, 其中不含底物且使用经优化的激酶量, 用于测定不依赖底物的 ATP 水解。该对照组应与激酶反应组具有相同的条件设置 (相同的反应体积, 缓冲液, 和 ATP 浓度)。不依赖底物的 ATP 水解可以指示酶的自磷酸化活性或酶制剂中存在其他 ATP 水解活性。

无抑制剂对照：是会获得最大信号的对照组, 其中添加化合物溶剂 (用于溶解测试化合物)。应为每一种应用不同溶剂的测试化合物设置一组对应的无抑制剂对照组。大多数情况下, 化合物溶剂由含 DMSO 的缓冲液系统组成。ADP-Glo™ Kinase Assay 可耐受不超过 5% DMSO。

已知抑制剂对照 (推荐)：使用一种已知的泛亚型或某种亚型特异性的抑制剂作为特异性抑制磷酸肌醇脂激酶的阳性对照, 设置三个重复的孔或一组系列稀释液。

6. 参考文献

1. Cantley, L.C. (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**, 1655–7.
2. Markman, B. *et al.* (2010) Status of PI3K inhibition and biomarker development in cancer therapeutics. *Annals Oncology* **21**, 683–91.
3. Brown, J.R. and Auger, K.R. (2011) Phylogenomics of phosphoinositide lipid kinases: perspectives on the evolution of second messenger signaling and drug discovery. *BMC Evolutionary Biology* **11**:4.
4. Hawkins, P.T. *et al.* (2006) Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 647–62.
5. Knight, Z.A. *et al.* (2007) A membrane capture assay for lipid kinase activity. *Nat. Protocols* **2**, 2459–66.
6. Tai, A.W., Bojireddy, N. and Balla, T. (2011) A homogenous and nonisotopic assay for phosphatidylinositol 4-kinases. *Anal. Biochem.* **417**, 97–102.
7. Li, H. *et al.* (2009) Evaluation of an antibody-free ADP detection assay: ADP-Glo. *Assay Drug Dev. Technol.* **7**, 598–605.

7. 附录

7.A. 磷酸肌醇脂激酶的分类

表 2. 磷酸肌醇脂激酶 (PIKs)。

Class	Enzyme	Accession No.	In vivo Substrate	In vitro Substrate	Function
Phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks)					
Class IA	PI3CA/PIKR1 (p110α/p85α)	U79143/ XM_043865	PI(4,5)P2	PI, PI(4)P, and PI(4,5)P2	Generate second messenger PI(3,4,5)P3. Regulate receptor tyrosine kinase and GPCR pathways.
	PI3CB/PIKR1 (p110β/p85α)	NM_006219/ XM_043865			
	PI3CD/PIKR1 (p110δ/p85α)	NM_005026/ XM_043865			
Class IB	PI3KCG (p120γ)	AF327656	PI	PI	Generate second messenger PI(3,4,5)P3. Regulate receptor tyrosine kinase and GPCR pathways.
Class II	PIK3C2A (PI3KC2α)	NP_002636.1	PI	PI	Generate PI3P, biological role less defined.
	PIK3C2B (PI3KC2β)	NP_002637.2			
	PIK3C2G (PI3KC2γ)	BC 130277			

表 2. 磷酸肌醇脂激酶 (PIKs) (接上页)。

Class	Enzyme	Accession No.	In vivo Substrate	In vitro Substrate	Function
Phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks; continued)					
Class III	PIK3C3 (hVPS34)	NP_002638.2	PI	PI	Associates with a hVps15; essential for vesicular traffic and autophagy.
Phosphoinositide-4-kinases (PI4Ks)					
Type II	PI42KA	NM_018425	PI	PI	Generate PI4P; catalyze the first committed step in phosphoinositide synthesis.
	PI4K2B	NM_018323			
Type III (PI3K Class IV)	PI4KA (PI4K α)	NP_00264.1	PI	PI	
	PI4KB (PI4K β)	NP_002642.1			
Phosphoinositide Phosphate-kinases (PIPKs)					
PIP5K1 Type I	PIP5K1A	NM_001135638	PI(4)P PI(3,4)P2	PI(4)P	Preferentially phosphorylate PI(4)P; generate PI(4,5)P2.
	PIP5K1B	NM_003558			
	PIP5K1C	NM_012398			
PIP4K2 Type II	PIP4K2A	NM_0050208	PI(5)P PI(3)P	PI(5)P	Preferentially phosphorylate PI(5)P; generate PI(4,5)P2.
	PIP4K2B	NM_003559.4			
	PIP4K2C	NM_001178000			
PIP5K3 Type III	PIP5K3 (PIKfyve)	NM_001178000	PI PI(3)P	PI PI(3)P	Generate PI(5)P and PI(3,5)P2.

7.B. 测定 K_m 值

ADP-Glo™ Lipid Kinases Systems 提供了一套完整的试剂可以使用化学发光法进行磷酸肌醇脂激酶 (PIK) 分析。为了便于对整个磷酸肌醇脂激酶 (PIKs) 家族进行酶学表征和抑制剂筛选的实验设置, 我们提供了测定缓冲液建议和使用推荐的测定条件测定的表观 K_m 值。ATP 表观 K_m 测定的示例见图 7。测定的 PI 脂激酶家族成员的表观 ATP K_m 值见表 3。

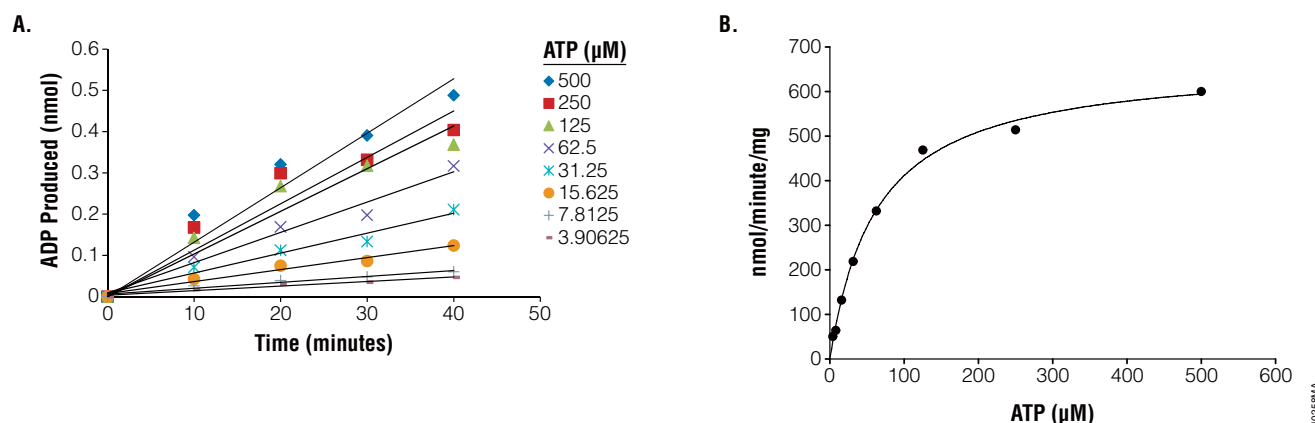


图 7. 表观 ATP K_m 测定示例。 为了测定 ATP K_m 值, 我们测定了 8 种不同水平 ATP 在不同时间下 ADP 的形成。反应在室温进行, 反应体积 25μl, 含 22ng PI3Kα 亚型。在每个 ATP 浓度下进行 ATP 到 ADP 转化曲线的制作, 并用于确定激酶反应中 ADP 的生成量。将产生的 ADP 量对反应时间作图, 并在每个 ATP 浓度下测定初始反应速度 (Panel A)。可以看到所有曲线都是线性的, 说明初速度条件已经满足。在 Panel B, 将初始速度数据与 ATP 浓度作图, 利用 SigmaPlot 11.0 软件将数据拟合为米氏方程, 计算表观 ATP K_m 值。

表 3. ATP 表观 K_m 值。

Enzyme	Substrate	Assay Buffer	ATP $K_{m, app}$ (μM)	Enzyme ($\mu g/ml$)
Class I PI3Ks				
PI3CA/PIK3R1 (p110 α /p85 α) Cat.# V1721	0.05mg/ml PIP2:3PS Cat.# V1701	PI3K Reaction Buffer	70	0.9
PI3CB/PIK3R1 (p110 β /p85 α) Cat.# V1751	0.05mg/ml PIP2:3PS Cat.# V1701	PI3K Reaction Buffer	125	3.2
PI3CD/PIK3R1 (p110 δ /p85 α) Cat.# V1771	0.05mg/ml PIP2:3PS Cat.# V1701	PI3K Reaction Buffer	80	1.9
PI3CG (p120 γ) Cat.# V1761	0.05mg/ml PIP2:3PS Cat.# V1701	PI3K Reaction Buffer	26	1.6
Class II PI3Ks				
PI3KC2A (PI3KC2 α)	0.15mg/ml PI:3PS Cat.# V1711	PI3K Reaction Buffer	20	2
PI3KC2B (PI3KC2 β)	0.15mg/ml PI:3PS Cat.# V1711	PI3K Reaction Buffer	50	2
PI3KC2G (PI3KC2 γ)	0.15mg/ml PI:3PS Cat.# V1711	PI3K Reaction Buffer	80	2
Class III PI3Ks				
PIK3C3 (hVPS34)	0.2mg/ml PI:PS Cat.# V1711	PI3K Reaction Buffer + 5mM $MnCl_2$	40	1
PI4Ks				
PI4K2A	0.1mg/ml PI:PS Cat.# V1711	PI3K Reaction Buffer + 0.2% Triton [®] X-100	60	1
PI4K2B	0.1mg/ml PI:PS Cat.# V1711	PI3K Reaction Buffer + 0.2% Triton [®] X-100	140	1
PI4KA (PI4K α)	0.1mg/ml PI:PS Cat.# V1711	PI3K Reaction Buffer + 0.2% Triton [®] X-100	70	1
PI4KB (PI4K β)	0.1mg/ml PI:PS Cat.# V1711	PI3K Reaction Buffer + 0.2% Triton [®] X-100	90	1

7.C. 计算激酶的比活性 (Specific Activity)

使用 ADP-Glo™ Assay, 相对光单位 (relative light unit, RLU) 与样品中 ADP 的量成正比, 因此可以通过 ATP 到 ADP 转化曲线直接计算激酶反应中 ADP 的生成量。为了计算酶的比活力, 需按照第 4.A 节所述创建酶滴定曲线。平行地, 按照第 3.C 节所述的方案创建 ATP 到 ADP 转化曲线。通过减去背景值计算净发光值 (net RLU)。绘制标准曲线 (ADP 的含量为 X 轴, RLU 值为 Y 轴) 并进行线性回归分析。通过比较激酶反应的 RLU 值与标准曲线, 使用插值法来计算激酶反应中 ADP 的生成量。通过用产生的 ADP 的量除以反应时间和酶用量来计算酶比活力。代表性酶活力数据示例如图 8 所示。

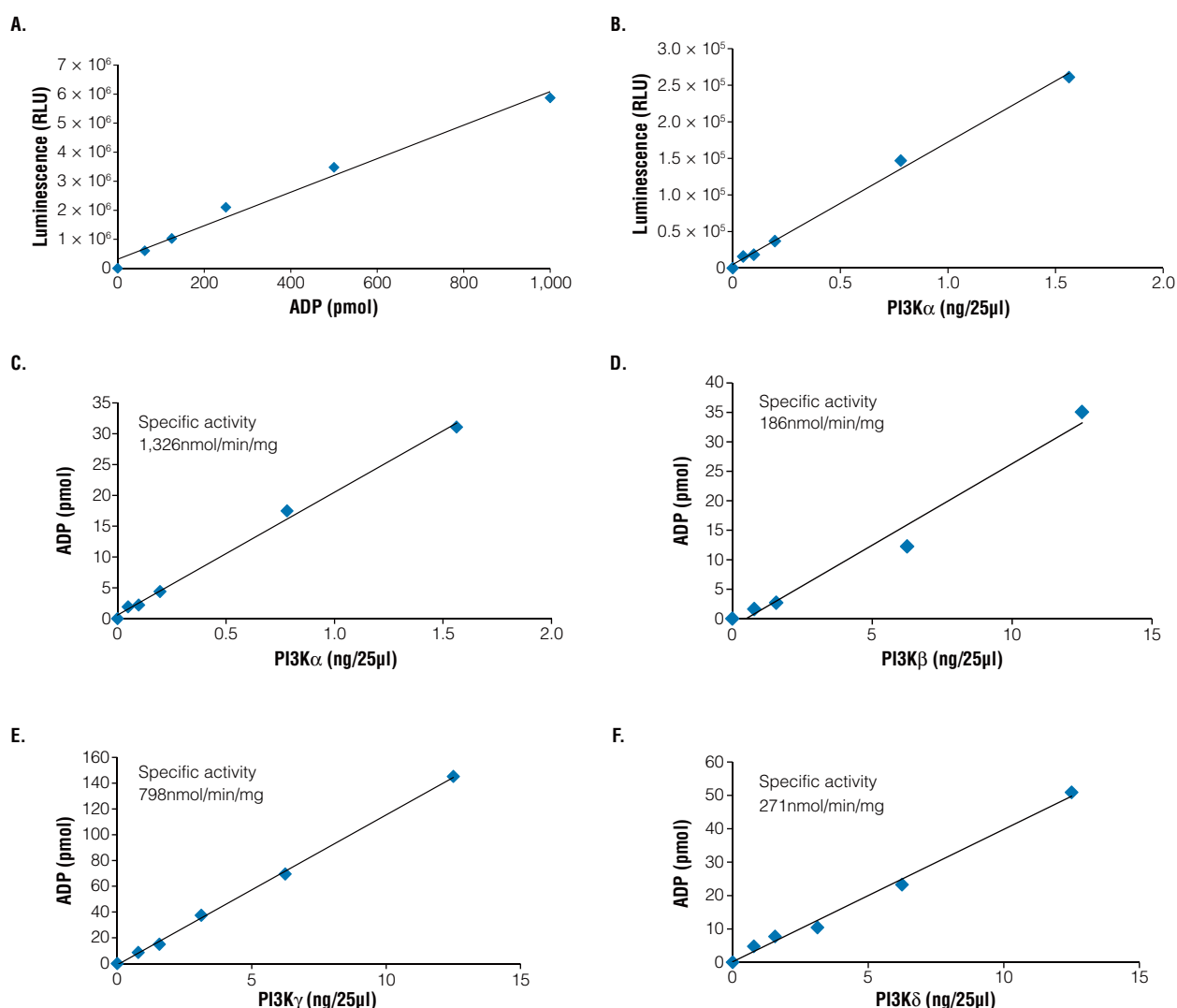


图 8. 酶滴定示例。 PI3K 脂激酶反应条件：使用 0.05mg/ml PIP2:3PS 脂质底物，100 μ M ATP，25 μ l 反应体积，在 30° C 孵育 15 分钟。ATP 到 ADP 转化曲线与 PI3K 脂激酶反应平行进行。ATP 到 ADP 转化数据采用线性回归分析，结果见 **Panel A**。**Panel B** 展示了 PI3K α 亚型滴定的原始数据示例，以净 RLU 值表示。在 **Panel C** 中，将来自 PI3K α 反应的发光信号与 ATP 到 ADP 转化曲线的发光信号进行比较，计算脂激酶反应中 ADP 的生成量。**Panels D - F** 展示了 β (D), γ (E) 和 δ (F) 亚型的酶滴定示例 (将反应产生的发光信号与转化曲线进行比较，计算脂激酶反应中 ADP 的生成量)。计算的比活力如图所示，这些结果是在蛋白终浓度为 0.06 μ g/ml (α)、0.125 μ g/ml (γ) 和 0.5 μ g/ml (β 和 δ) 时测定。

8. 相关产品

ADP/ATP 检测系统和激酶系统 (KES)

产品	规格	目录号
ADP-Glo™ Kinase Assay	400 assays	V6930
	1,000 assays	V9101
	10,000 assays	V9102
	100,000 assays	V9103
ADP-Glo™ Max Assay	1,000 assays	V7001
	10,000 assays	V7002

Promega 为众多的蛋白激酶提供 **Kinase Enzyme Systems** (KES) 以助力您破译人类激酶组, KES 中包括激酶, 优选的底物, 缓冲液和其他成分。这些激酶系统 (KES) 已经过优化以配合 ADP-Glo™ Kinase Assay 使用, 并且可以一同订购。人类的蛋白激酶组由 500 多个蛋白激酶基因组成, 这些蛋白激酶基因可以根据序列同源性分组。组别缩写如下: **AGC**: 包括 PKA, PKG, PKC 家族; **CAMK**: 钙离子 / 钙调蛋白依赖蛋白激酶; **CK1**: 酪蛋白激酶 1; **CMGC**: 包括 CDK, MAPK, GSK3, CLK 家族; **STE**: 酵母 Sterile 7、Sterile 11、Sterile 20 激酶的同源物; **TK**: 酪氨酸激酶; **TKL**: 酪氨酸激酶样。有关这些系统的详细信息, 请访问: www.promega.com/products/cell-signaling/kinase-assays-and-kinase-biology/

产品	规格	目录号
Kinase-Glo® Luminescent Kinase Assay	10ml	V6711
	10 × 10ml	V6712
	100ml	V6713
	10 × 100ml	V6714
Kinase-Glo® Plus Luminescent Kinase Assay	10ml	V3771
	10 × 10ml	V3772
	100ml	V3773
	10 × 100ml	V3774
Kinase-Glo® Max Luminescent Kinase Assay	10ml	V6071
	10 × 10ml	V6072
	100ml	V6072
	10 × 100ml	V6073

脂激酶抑制剂

产品	规格	目录号
LY 294002	5mg	V1201

9. 修订总结

该文件的 10/22 版本进行了如下修订：

1. 修正了第 3.B 节操作步骤的编号。
2. 更新了免责声明。
3. 进行了微小的文字编辑修改。
4. 更新了封面和字体。

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

(b)U.S. Pat. Nos. 7,741,067, 8,361,793, and 8,603,767, Japanese Pat. No. 4485470 and other patents pending.

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

© 2012–2022 Promega Corporation. All Rights Reserved.

GloMax and Kinase-Glo are registered trademarks of Promega Corporation. ADP-Glo and PI3K-Glo are trademarks of Promega Corporation.

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.