

Kinase-Glo[®] 激酶活性检测试剂盒



在 GloMax[®] 96 微孔板发光检测仪上的应用

1. 应用说明

GloMax[®] 96 微孔板发光检测仪和Promega公司的Kinase-Glo[™]激酶活性检测试剂盒联合使用为激酶反应后溶液中ATP 的定量提供了一种方便、快速且灵敏的方法。激酶是根据初始识别对特定氨基酸进行磷酸化的一大类酶，因此蛋白激酶在细胞信号传导和药物研究靶目标中起着关键性的作用，科学的发展也进一步验证了激酶在药物导向方面有着潜在应用价值，例如丝氨酸/苏氨酸，cAMP依赖物，酪蛋白和MAP 激酶被明确地用于药物的研究。

Kinase-Glo[™]激酶活性检测试剂盒是一种通过激酶和底物反应，均质荧光素酶检测方法。激酶底物可以是多肽、蛋白或脂肪。荧光素酶通常被用于研究培养细胞的生物学特性，由于哺乳动物细胞中无内源荧光素酶，在荧光素酶基础上进行激酶分析会更快速、可靠和方便。Kinase-Glo[™]激酶检测试剂盒中使用UltraGlow[™]荧光素酶可以产生长达4h 稳定的辉光型信号。长时间的光信号使多板高通量筛选成为可能。

荧光素酶反应中需要ATP 的参加，激酶磷酸化反应中也需要消耗ATP，当激酶反应结束，加入等体积的Kinase-Glo[™]测量发光信号，光信号和体系中的ATP 成正比，和体系中激酶活性成反比（图1）。为了得到最佳检测结果，试剂盒使用中，强烈建议进行参数优化。

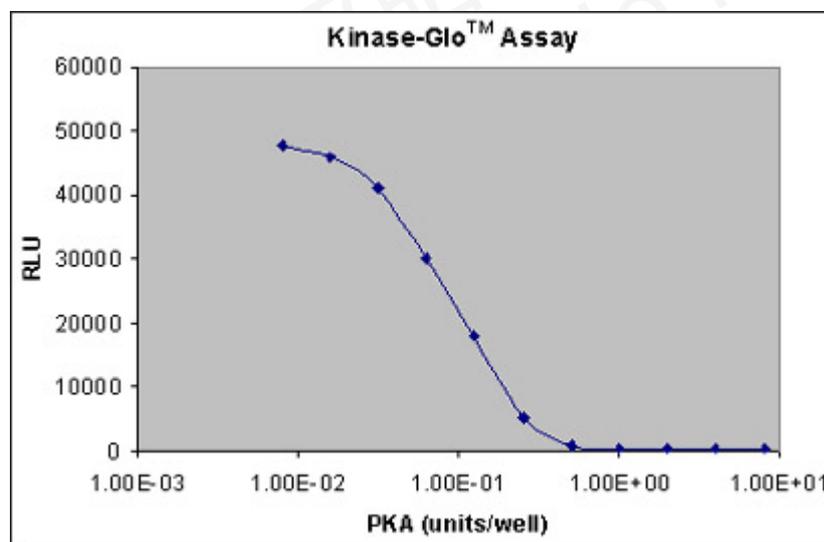


图1 发光信号和激酶活性成反比

在含有 5 μ M Kemptide 底物和1 μ M ATP 的50ul 激酶检测缓冲液(40 mM Tris [pH 7.5], 20 mM MgAc, 0.1% BSA)中2 倍倍比稀释PKA。室温下孵育30min，而后加入Kinase-Glo[™]试剂，在GloMax[®] 96 微孔板发光检测仪上每孔检测时间为1s。

GloMax[®] 96 微孔板发光检测仪具有高灵敏度和较宽线性检测范围，Kinase-Glo[™]试剂盒能产生最高灵敏度和长时间的发光信号，Kinase-Glo[™]适合与大部分的有机溶剂兼容，包括DMSO。使用Kinase-Glo[™]底物在GloMax[®] 96 微孔板发光检测仪上最低可检测到 2.01×10^{-15} mol ATP，线性范围从1pg 到1ng，3 个数量级（图2），所有的检测均采用ATP 标准物(P/N# FF2000)。

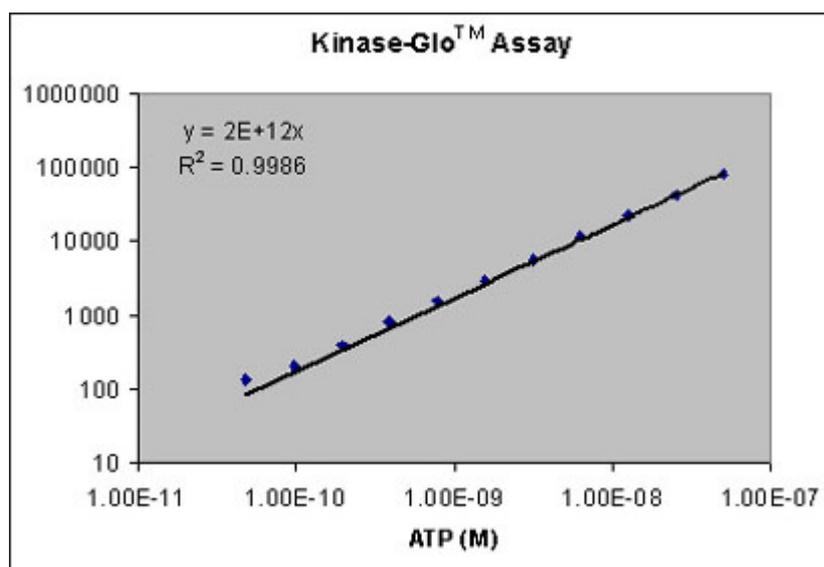


图2 光信号和 ATP 浓度函数图。50ul 缓冲液（40 mM Tris [pH 7.5], 20 mM MgAc, 0.1% BSA）中 2 倍倍比稀释 ATP，接着加入 Kinase-Glo™试剂，室温下孵育 10min 后在 GloMax®96 微孔板发光检测仪上检测。

2. 所需器材

- [GloMax® 96微孔板发光检测仪](#)
- 96 孔白板
- Kinase-Glo™激酶分析试剂盒
- P200 移液器和枪头

3. 实验方案

3.1 试剂制备

- a) Kinase-Glo™底物：使用所提供产品，-20℃储存。
- b) Kinase-Glo™缓冲液：使用所提供产品，-20℃储存。
- c) Kinase-Glo™试剂：融解Kinase-Glo™缓冲液，而后室温平衡，为了使用时方便，也可以使用前将缓冲液解冻室温储存48h。室温下平衡Kinase-Glo™冻干底物。将一整瓶的缓冲液倒入底物瓶中，轻轻颠倒混匀，直到底物彻底溶解，大约1min。工作液配好立刻使用，也可以分装-20℃保存。

注意：因为荧光素酶活性受温度影响，在定量发光检测过程中，Kinase-Glo™试剂应始终保持室温。混合试剂冻存后再次使用，为确保试剂性能，应在低于25℃条件下溶解。溶解后充分混匀，最简单的方法是室温水浴溶解。

3.2 仪器安装

3.2.1 双击GloMax 96 图标运行软件。

3.2.2 从"Welcome to GloMax 96"对话框中点击"Run Promega Protocol"。

3.2.3 从Promega 预设程序中选择"KinaseGlo"。

3.2.4 在"Main Dialog Box"中输入个人相关信息如"Experiment", "Operator", "Plate No.", and

"Notes".

3.2.5 在"Main Dialog Box"中点击"Options", 选择需要检测孔, 修改检测次数, 修改结束点击"Apply Changes"同时返回"Main Dialog Box"窗口

4. 系统优化

强烈建议优化激酶反应中的ATP 量和激酶底物。对于96 孔板, 建议50ul 激酶反应体系和50ul Kinase-Glo™试剂构建100ul 总反应体系。对于其他反应体系时, 保证激酶反应量和Kinase-Glo™试剂量为1: 1。

4.1 ATP 浓度优化

4.1.1 板子上2 倍倍比稀释ATP 标准物, 加入足量激酶和激酶底物。稀释相同浓度的ATP 标准物, 但是不加入激酶底物或者激酶, 将其作为对照。激酶反应中尽可能地消耗ATP, 使得激酶活性最小化, 或许需要几个小时。

4.1.2 加入等体积的Kinase-Glo™试剂。

4.1.3 充分混合, 室温孵育10min, 使发光信号稳定。

4.1.4 将检测板放入GloMax®96 微孔板发光检测仪中点击"Start"开始检测。和没有激酶和激酶底物的孔中检测数值相比, 理想的ATP 浓度检测发光值会有很大的不同。

4.2 激酶底物浓度优化

4.2.1 用足量激酶和适量ATP, 按照步骤4.1 中所确定的量2 倍倍比稀释激酶底物。不加入激酶的, 将其作为对照。激酶磷酸化尽可能地消耗底物, 使得激酶活性最小化, 或许需要几个小时。

4.2.2 加入等体积的Kinase-Glo™试剂

4.2.3 充分混合, 室温孵育10min, 使发光信号稳定。

4.2.4 将检测板放入GloMax®96 微孔板发光检测仪中点击"Start"开始检测。和没有激酶的孔中检测数值相比, 理想的底物浓度检测发光值会有很大的不同。

4.3 激酶浓度优化

4.3.1 用按照步骤4.1 中所确定的ATP 量和步骤4.2 中所确定激酶底物量2 倍倍比稀释激酶。激酶磷酸化尽可能地消耗底物和ATP, 使得激酶活性最小化, 或许需要几个小时。

4.3.2 加入等体积的Kinase-Glo™试剂

4.3.3 充分混合, 室温孵育10min, 使发光信号稳定。

4.3.4 将检测板放入GloMax®96 微孔板发光检测仪中点击"Start"开始检测。理想的激酶浓度应该在激酶滴定曲线的线性范围内。

5. 样品分析

5.1 将优化的ATP、激酶和激酶底物混合, 孵育足够时间使得激酶能充分消耗掉ATP。加入等体积的Kinase-Glo™试剂, 充分混合, 室温孵育10min, 使发光信号稳定。

5.2 将检测板放入GloMax®96 微孔板发光检测仪中点击"Start"开始检测。RLU 值会以Excel 电子表格形式将每排检测数值显示出来。如遇到错误信息, 可参照问题导读获取更多信息。

注: 检测结束, 确保从仪器中取出检测板!

6. 关于 GloMax®96 微孔板发光检测仪

GloMax®96 微孔板发光检测仪是一款专门用于生物发光与化学发光检测的微孔板型发光检测仪。GloMax®96 微孔板发光检测仪发光检测仪具有极高的检测灵敏度(3×10^{-21} moles 荧光素酶)和极宽的检测范围 (>9 数量级), 可以满足各种发光检测的需求。