



产品使用说明书

Rhinogen[®] Kinase-Turbo[™] ADP 激酶 活性检测试剂盒

货号：RA-GL16



目 录

目录	1
产品信息	2
试剂包装	2
存储条件	2
产品综述	3
背景	3
概述	3
应用	5
特性	5
操作方法	6
试剂准备	6
自备材料	6
检测步骤	6
确定最佳底物浓度	7
确定激酶最佳用量	7
操作说明	7
相关产品	9
联系我们	10

产品信息

试剂包装 Rhinogen® Kinase-Turbo™ ADP 激酶活性检测试剂盒包装规格如下：

注：可用于 96 孔板（25µl: 25µl: 50µl），足够进行 200tests，

试剂名称	货号	规格
Rhinogen® Kinase-Turbo™ ADP 激酶 活性检测试剂盒	RA-GL16	200tests

Rhinogen® Kinase-Turbo™ ADP 激酶活性检测试剂盒具体组分如下：

试剂组分	货号	规格
First reagent	RA-GL16A	5ml
Second reagent	RA-GL16B	10ml
10mM ATP	RA-GL16C	500µl
10mM ADP	RA-GL16D	500µl

存储条件 采用冰袋运输，收到产品后请立即置于-20°C及以下条件下储存。

使用前，先将所有组分置于室温条件下完全解冻混匀。未使用完的组分进行分装，并置于-20°C及以下条件下储存。First reagent和Second reagent可在室温（22°C）下放置24小时而不会失去信号。

产品综述

背景 由于转移酶、尤其是激酶的生理相关性、多样性和普遍存在，它们成为生化和医学研究中最重要并被广泛研究的一类酶家族。许多目前可用的激酶测定使用在反应期间消耗大量ATP的酶而运行良好，但对检测ATP量的少量变化而言则不够灵敏，这限制了具有低ATP周转率的激酶（例如生长因子受体激酶）的检测，因此需要一种高灵敏度测定方法来筛选低活性激酶。

概述 Rhinogen® Kinase-Turbo™ ADP激酶活性检测试剂盒是一种发光型ADP检测试剂盒，它提供了一种通用、均质、高通量的筛选方法通过量化激酶反应过程中产生的ADP量来测量激酶活性。Rhinogen® Kinase-Turbo™ ADP激酶活性检测试剂盒可用于监测几乎所有能产生ADP的激酶的活性。Rhinogen® Kinase-Turbo™ ADP激酶活性检测试剂盒可检测使用0-10μM ATP的酶（如激酶或ATP酶）的活性。ADP激酶测定在多孔板中进行，可在低至5μl的反应体积内检测激酶活性。

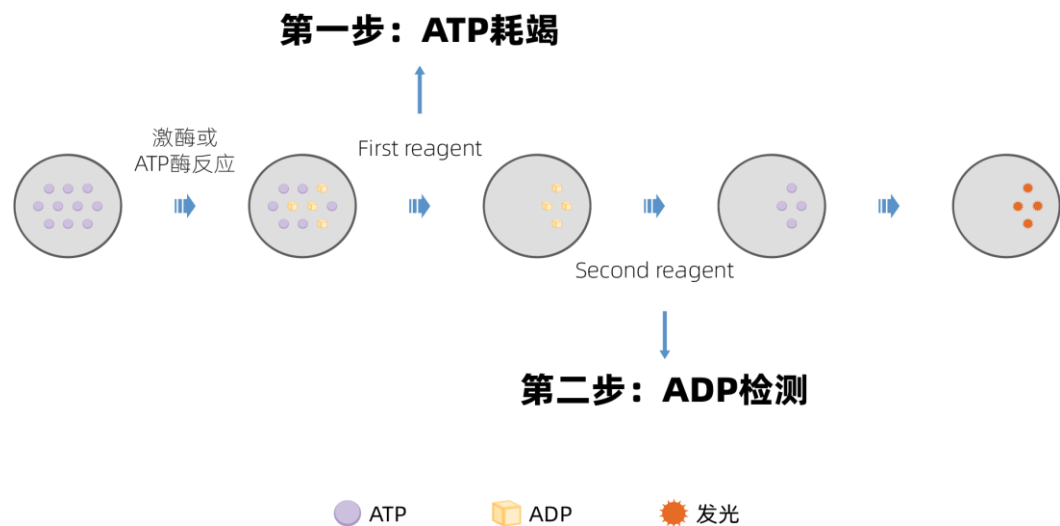


图1 ADP检测试剂盒测定原理

检测分两步进行：

首先，在激酶反应后，加入等体积的First reagent试剂以终止激酶反应并耗尽剩余的ATP。其次，加入Second reagent试剂，同时将ADP转化为ATP，并利用荧光素酶/荧光素反应测量新生成的ATP。产生的发光信号用酶标仪测量。通过ATP到ADP的转换曲线，可将发光值与ADP浓度相关联。

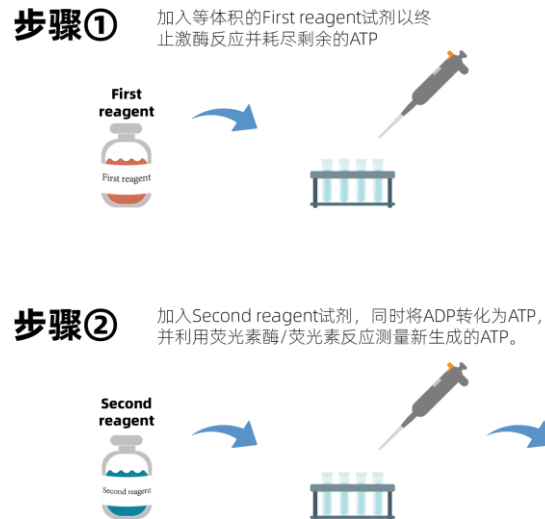


图2 ADP检测试剂盒检测流程图

这种检测方法的灵敏度足以检测到极低量的ADP，并可在含有 $10\mu\text{M}$ ATP（图3）和 $1\mu\text{M}$ ATP（图4）的反应中以线性方式检测生成的ADP。所产生的发光信号与所产生的ADP浓度成正比，并与激酶活性相关。

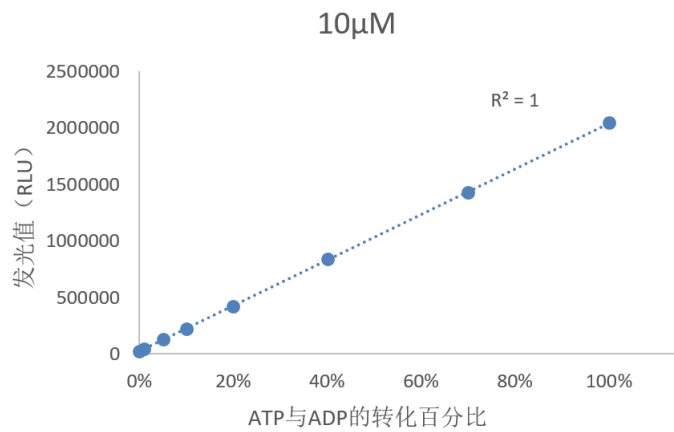


图3 ADP激酶检测的线性情况（10 μM ）

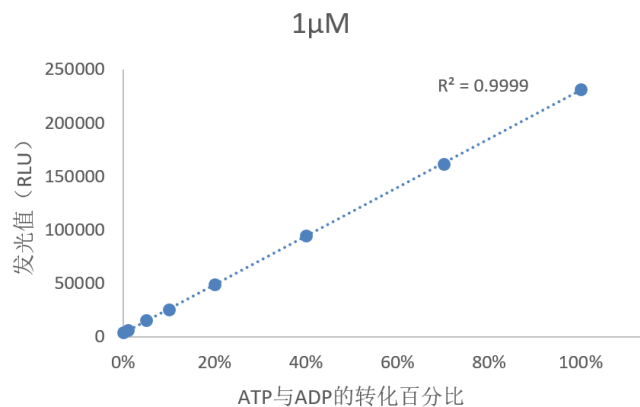


图4 ADP激酶检测的线性情况（1 μM ）

应用

Rhinogen[®] Kinase-Turbo[™] ADP激酶活性检测试剂盒几乎可以使用任何激酶和底物组合，而且不需要放射性标记的成分或抗体。激酶底物可以是肽、蛋白质、脂质或糖。由于Rhinogen[®] Kinase-Turbo[™] ADP激酶活性检测试剂盒测定法灵敏度高，基本上可用于所有激酶，尤其是酶周转率低的激酶，如生长因子受体酪氨酸激酶。因此，该检测法是高通量筛选的理想选择，因为少量的酶和较低的ATP-ADP转化率就能产生较高的信号-背景比。

Rhinogen[®] Kinase-Turbo[™] ADP激酶活性检测试剂盒可产生稳定的发光信号，并在各种检测条件下提高性能。加入Second reagent后，荧光素酶反应产生的信号可稳定持续3小时以上。由于稳定性更强，因此不需要配备注射器的荧光测定仪，也可对多个平板进行批量处理。此外，荧光素酶与First reagent试剂和Second reagent检测试剂专有配方的独特组合，使其发光效果比其他基于荧光素酶或荧光的检测方法更不易受文库化合物的干扰。

特性

- **动态范围大：**在ATP与ADP的转换率较低时，信号与背景的比率较高，因此可以使用较少量的酶。
 - **灵敏度高：**检测1nmol ADP的灵敏度是背景灵敏度的2倍以上。
 - **通用检测：**可使用任何激酶和激酶与底物的组合，包括肽、蛋白质、脂质和糖底物。
 - **正相关：**检测信号随生成物的增加而线性增加。
 - **基于发光的ADP检测：**减少化学物质对整个检测过程的干扰。
 - **批量平板处理：**发光信号高度稳定，3小时后信号增加比例小于20%。
 - **均一、稳健、无放射性的检测方法。**
-

操作方法

试剂准备

1. 使用前将所有试剂解冻平衡至室温（18~22°C）。
2. 解冻后彻底混匀所有组分。
3. 激酶检测试剂应立即使用，或分装成等量试剂并保存在 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 。

自备材料

- 96/384 孔白板
- 多通道移液器
- 激酶底物
- 激酶
- 酶标仪
- 恒温振荡仪

检测步骤

一、生成 ATP 转换为 ADP 的标准曲线

为了计算激酶反应中产生的ADP量，我们建议根据激酶反应中使用的ATP浓度，绘制一条标准曲线（“ATP-ADP转换曲线”），该曲线代表ATP转换为ADP时相应的发光量。这些转换曲线代表了在指定转换百分比下反应中可用的ATP和ADP的数量（表1），由适当体积的ATP和ADP储备溶液混合而成（表2）。ATP和ADP总浓度在本说明书中称为“ATP+ADP”。

下文以在96孔板中制备 10 μM ATP+ADP标准曲线为例：

1. 将提供的高纯ATP和ADP在1 \times 激酶反应缓冲液中稀释，制备1ml 10 μM ATP和500 μl 10 μM ADP。
注：建议使用高纯ATP，其他来源的ATP可能含有会导致高背景的ADP。
2. 将10 μM ATP和10 μM ADP溶液按参照下表2按比例添加，生成10 μM 标准曲线以模拟各转化率下的ATP和ADP浓度。
3. 将配制好的ATP+ADP按所需的量（25 μl ）分别转移到检测板或存在激酶反应的检测板的不同孔中。

表1 标准曲线所代表的ATP转化为ADP的百分比

ADP %	100	70	40	20	10	5	1	0
ATP %	0	30	60	80	90	95	99	100

表2 10 μM ATP+ADP标准曲线的制备

孔板编号	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
10 μM ADP (μl)	100	70	40	20	10	5	1	0
10 μM ATP (μl)	0	30	60	80	90	95	99	100

二、ADP激酶测定

激酶反应完成后，ADP激酶检测分两步进行。对于96孔板，我们建议使用25 μl 激酶反应缓冲液、25 μl First reagent和50 μl Second reagent，总体积为100 μl 。对于384孔板，体积减少5倍，即5 μl 激酶反应缓冲液、5 μl First reagent和10 μl Second reagent。只要保持激酶反应体积与First reagent和Second reagent体积为1:1:2的比例，也可以使用其他体积。用于96孔板的ADP激酶检测规程概述如下：

1. 使用1×激酶反应缓冲液进行25μl激酶反应。
注：如果激酶反应不是在室温下进行，则在加入First reagent试剂前将平板平衡至室温。
2. 向激酶反应样品中加入25μl First reagent。
注：最终Mg²⁺浓度不应低于0.5mM。
3. 室温下孵育30分钟。
4. 加入10μl Second reagent。
5. 振荡混匀后在室温下孵育5分钟，用平板读数发光仪或电荷耦合器件（CCD）相机测量发光。
注：仪器设置取决于制造商。每孔的积分时间应为0.25-1秒。ADP激酶检测信号的半衰期较长，如果需要，可在读数前将板在室温下放置更长时间。

确定最佳底物浓度

1. 使用尽可能多的激酶和所需浓度的ATP，将1×激酶反应缓冲液中的激酶底物在平板上连续稀释两倍。作为对照，在没有激酶的情况下进行同样的滴定。混合平板，孵育所需时间。
2. 按照操作方法，从“二、ADP激酶测定”步骤2开始操作。
3. 记录发光。
注：最佳激酶底物浓度将导致激酶反应孔与不含激酶孔之间的发光差异最大。

确定激酶最佳用量

1. 使用所需量的ATP和激酶底物（如前所述），在1×激酶反应缓冲液中，在平板上连续稀释两倍的激酶。混合平板，孵育所需时间。
注：我们建议在室温下优化激酶反应条件，以确保ADP分析期间整个平板温度均匀。
2. 按照操作方法，从“二、ADP激酶测定”步骤2开始操作。
3. 记录发光。
注：用于后续化合物筛选和IC₅₀测定的最佳激酶用量是在激酶滴定曲线的线性范围内产生发光并产生足够的信号-背景比的量。

操作说明

温度：Rhinogen® Kinase-Turbo™ ADP激酶活性检测试剂盒的发光信号的强度和稳定性取决于荧光素酶反应的速率。影响荧光素酶反应速率的环境因素会导致光输出强度和发光信号的稳定性发生变化。温度是影响荧光素酶反应速率的一个因素，因此也会影响光输出。为了获得一致的结果，在加入Rhinogen® Kinase-Turbo™ ADP激酶活性检测试剂盒试剂之前，应将检测板和试剂平衡至室温。如果平衡不充分，可能会导致平板中心孔和边缘孔之间出现温度梯度，从而导致整个平板的温度变化。

溶剂和其他化学品：进行激酶测定第一步或第二步的化学环境会影响酶解速率，从而影响发光强度。我们建议激酶缓冲液的pH值为7-8。用于重悬各种测试化合物或激酶反应试剂的某些载体可能会干扰荧光素酶反应，从而影响检测的光输出。多种化学试剂已被证明与Rhinogen® Kinase-Turbo™ ADP激酶活性检测试剂盒兼容或可以耐受。在没有激酶或激酶底物的情况下，使用ADP作为底物检测一组平行对照孔，可以检测出对荧光素酶反应的干扰。

孔板建议：我们建议使用适合发光测量的标准纯白色多孔板。请联系您的酶标仪制造商，了解哪种平板最适合您的特定仪器。

测试干扰Rhinogen® Kinase-Turbo™ ADP激酶活性检测试剂盒测定的化合物：仅抑制激酶的测试化合物会比仅抑制载体的对照组发出较低的荧光，并且很容易与抑制检

测其它成分的化合物区分开来。抑制测定其他成分的测试化合物。根据激酶、荧光素酶或其他酶成分的抑制程度，单独使用或与激酶一起使用都可能增加、减少或不影响发光信号。要检测激酶筛选的结果是否会对ATP的酶耗竭或发光信号的产生造成化学干扰，可设置不含激酶但含有所有其他检测成分的模拟反应，包括ADP和ATP的混合物，以模拟激酶反应的结果。如生成ATP向ADP转化的标准曲线所述，向不含激酶但含有最终浓度为 $2\mu\text{M}$ ADP和 $8\mu\text{M}$ ATP的模拟反应中加入适当浓度的受试化合物（通常为 $10\mu\text{M}$ ）或载体对照（如1%二甲基亚砷）。与不含测试化合物的载体对照反应相比，影响检测性能的测试化合物会使发光改变20%以上。对多种不同化学类别的ATP竞争性抑制剂进行测试的结果表明，没有一种抑制剂会干扰Rhinogen® Kinase-Turbo™ ADP激酶活性检测试剂盒激酶试验。抑制荧光素酶的测试化合物可能会导致误检。然而，Rhinogen® Kinase-Turbo™ ADP激酶活性检测试剂盒的专有生物成分的可显著减少误检次数。

相关产品

产品名称	货号
Bio-Glory™One-Step 萤火虫荧光素酶分析试剂盒	RA-GL04
Bio-One™One-Step 萤火虫荧光素酶分析试剂盒	RA-GL05
Bio-Steady™One-Step 萤火虫荧光素酶分析试剂盒	RA-GL06
Bio-Bright™One-Step 萤火虫荧光素酶分析试剂盒	RA-GL07
CellTiterTurbo2.0 Luminescent Cell Viability Assay	RA-GL11-A
CellTiterTurbo3D Luminescent Cell Viability Assay	RA-GL12-A
Kinase-Turbo™ 激酶活性检测试剂盒	RA-GL13

联系我们

如果您需要帮助，我们的客户支持专家可以通过电话和 email 为您提供帮助：

- 电 话：[0512-87663137](tel:0512-87663137)
 - 技术支持：techserv@rhinobio.com
-

RHINO BIO



上海瑞诺生物科技有限公司
苏州瑞特佰生物科技有限公司
网 址 : www.rhinobio.com
电 话 : 0512-87663137
邮 箱 : techserv@rhinobio.com

