

Neo-Glo® 激酶ADP Max检测试剂盒

Neo-Glo® Kinase ADP Max Assay Kit



产品规格

产品货号	组分	可检测 96 孔板孔数	可检测 384 孔板孔数
KAS001P.1000	ATP Max 去除试剂 5 ml	200 wells	1,000 wells
	ADP Max 检测试剂 10 ml		
	ATP (100mM) 0.25 ml		
	ADP (10mM) 1 ml		
KAS001P.10000	ATP Max 去除试剂 50 ml	2,000 wells	10,000 wells
	ADP Max 检测试剂 100 ml		
	ATP (100mM) 2.5 ml		
	ADP (10mM) 5 ml		

保存条件

-20°C或以下避光储存。

产品描述

Neo-Glo® 激酶ADP Max检测试剂盒 通过检测激酶反应过程中ADP的生成量来检测激酶活性。ADP被转化成ATP，然后ATP再被荧光素酶催化发光，发光信号与激酶活性呈正相关，从而达到检测激酶活性的目的。该试剂盒稳定的发光信号使其特别适合激酶抑制物的高通量筛选，并且能够通过调节ATP浓度来鉴别ATP竞争性与非竞争性抑制剂。该试剂盒可用于监测任何ADP生成酶（例如激酶或ATP酶）活性，激酶底物包括多肽，蛋白，脂或糖等。检测过程分为3个步骤：首先进行激酶反应，然后终止激酶反应并去除ATP，最后进行ADP检测。使用Neo-Glo® 激酶ADP Max检测试剂盒时激酶反应中的ATP浓度最高可至5mM。

实验步骤

激酶反应

1. 在96孔或384孔白色不透明板中进行激酶反应。建议96孔板反应体系为25 μ l，384孔板反应体系为5 μ l。可以在激酶反应中加入不同浓度梯度的测试化合物。
2. 激酶反应体系中的激酶和底物浓度需要根据不同的激酶进行优化。在实验所需的适当信噪比的情况下，可以采用在信号线性反应范围的激酶浓度进行检测。（由于Neo-Glo® 激酶ADP Max检测试剂盒的灵敏度高，激酶用量可以大幅降低。）

Note: ATP的浓度最高可至5mM，不低于0.5mM。对于ATP浓度低于0.5mM的激酶反应，建议使用Neo-Glo® 激酶ADP检测试剂盒（目录号KAS001）以获得最优实验结果。一些市售的ATP可能含有ADP残余，由于Neo-Glo® 激酶ADP Max检测试剂盒的高灵敏度，ATP中的ADP残余会导致高背景，因此激酶反应需使用高纯度的ATP（例如Sigma-Aldrich品牌ATP，货号A2383，纯度 $\geq$ 99%）或其他更高纯度的ATP。

3. 激酶反应可以在通用反应缓冲液中进行 (40mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 mg/ml BSA, 20mM MgCl₂) 或采用文献报道的反应缓冲液和辅助因子。
4. 激酶反应的温度和时间需根据不同激酶而设定。进行化合物高通量筛选实验时, 建议在室温 (22°C-25°C) 条件下优化激酶反应, 确保检测期间孔板温度均一。
5. 激酶反应结束后不需要加入额外试剂终止激酶反应。如果因特殊实验要求需要加入激酶反应终止试剂, 请避免使用镁离子螯合剂, 例如EDTA。因为本试剂盒检测时需要镁离子参与反应, 镁离子的终浓度必须至少为5mM。

激酶反应后去除ATP

1. 取出 ATP Max 去除试剂, 平衡至室温 (22°C-25°C)。轻摇混匀。

Note 1: 首次使用试剂后应分装并于-20°C及以下避光储存, 以保证试剂的稳定性。ATP Max去除试剂和ADP Max检测试剂反复冻融3次, 或者4°C放置3天, 信号强度和功能均无损失。

Note 2: 长期保存于-20°C的ADP Max检测试剂解冻至室温后可能会存在少许沉淀, 可以直接吸取上清或离心去除沉淀后使用。

Note 3: 不同批次的试剂不建议混用。

2. 如果激酶反应是在非室温条件下进行的 (例如30°C), 需要先将检测板平衡至室温。

Note: ADP Max检测试剂中的荧光素酶反应对温度变化敏感。试剂和样品/检测板需要平衡到室温 (22°C-25°C), 检测过程温度保持恒定 ($\pm 1^\circ\text{C}$)。

3. 将25 μl 的ATP Max去除试剂加入以上25 μl 96孔检测板中 (总体积50 μl) 或加5 μl ATP Max去除试剂到5 μl 384孔检测板中 (总体积10 μl), 振荡混匀。

Note: 非经严格验证, 不建议随意改变反应试剂用量。激酶反应体系、ATP Max去除试剂和ADP Max检测试剂的体积需为1:1:2。

4. 室温孵育40分钟。

激酶活性测定 (ADP检测)

1. 取出ADP Max检测试剂, 平衡至室温。轻摇混匀。

Note: ADP Max检测试剂中的荧光素酶反应对温度变化敏感。试剂和样品/检测板需要平衡到室温 (22°C-25°C), 检测过程温度保持恒定 ($\pm 1^\circ\text{C}$)。

2. 将50 μl 的ADP Max检测试剂加入以上50 μl 96孔检测板中, 或加10 μl ADP Max检测试剂到以上10 μl 384孔检测板中, 振荡混匀。室温避光孵育30分钟。

3. 在加入ADP Max检测试剂后30-180分钟或更长时间内读取发光信号。

Note: 本产品发光信号非常稳定, 3小时内信号强度下降<20%。

注意事项

试验中请穿着试验服并带手套做好防护工作。请按实验室安全操作规范进行实验。

本试剂 **仅供科研使用**, 请勿用于临床诊断或其他治疗用途。

V06/25