

Neo-Glo[®] 激酶ADP检测试剂盒

Neo-Glo[®] Kinase ADP Assay Kit



试剂盒组分

Neo-Glo[®] 激酶 ADP 检测试剂盒由 ATP 去除试剂、ADP 检测试剂、ATP 试剂和 ADP 试剂 4 部分组成，规格如下：

产品货号	规格	可检测 96 孔板数	可检测 384 孔板数
KAS001.400	ATP 去除试剂 2 mL	80 wells	400 wells
	ADP 检测试剂 4 mL		
	ATP (10mM, 0.5mL)		
	ADP (10mM, 0.5mL)		
KAS001.1000	ATP 去除试剂 5 mL	200 wells	1,000 wells
	ADP 检测试剂 10 mL		
	ATP (10mM, 0.5mL)		
	ADP (10mM, 0.5mL)		
KAS001.10000	ATP 去除试剂 50 mL	2,000 wells	10,000 wells
	ADP 检测试剂 100 mL		
	ATP (10mM, 5mL)		
	ADP (10mM, 5mL)		
KAS001.100000	ATP 去除试剂 10×50 mL	20,000 wells	100,000 wells
	ADP 检测试剂 10×100 mL		
	ATP (10mM, 10×5mL)		
	ADP (10mM, 10×5mL)		

保存条件

Neo-Glo[®] 激酶ADP检测试剂盒需要干冰运输。在-20℃及以下避光储存，有效期12个月。

Note: 所有试剂的批号见标签。

检测原理

Neo-Glo[®] 激酶 ADP 检测试剂盒 (Neo-Glo[®] Kinase ADP Assay Kit) 是一款生物发光法 ADP 检测试剂盒，可用于定量激酶反应过程中 ADP 生成量，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 检测试剂盒时激酶反应中的 ATP 浓度最高可至 1mM。

实验步骤

激酶反应

1. 在96孔或384孔纯白色不透光多孔板中进行激酶反应。建议96孔板反应体系为25μL，384孔板反应体系为5μL。可以在激酶反应中加入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检测试剂盒的高度灵敏性，激酶用量可以大大降低。）

Note: ATP的浓度最高可至1mM。一些市售的ATP可能含有ADP残余，由于Neo-Glo® 激酶ADP检测试剂盒的高度灵敏性，ATP中的ADP残余会导致高实验背景，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≥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检测时，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匀。

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，不得使用镁离子螯合剂，例如EDTA。因为本试剂盒检测中需要镁离子参与反应。

激酶反应后去除ATP

1. 取出ATP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，保证试剂的稳定性。ATP去除试剂和ADP检测试剂反复冻融7次，或者放置于室温(22°C)24hr，或者放置于4°C环境7天，信号强度和功能均无损失。

Note 2: 长期保存于4°C (>5天)的ADP检测试剂再次冻存后融化使用时可能会存在少许沉淀，可以直接吸取上清试剂使用或离心去除沉淀后使用。

Note 3: 不建议不同批次混用。

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

Note: ADP检测试剂中的荧光素酶反应对温度变化敏感。试剂和测试样品/检测板需要平衡到室温（22°C-25°C），测试过程温度保持恒定（±1°C）。

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

Note: 非经严格验证，不建议随意改变反应试剂用量。激酶反应中，ATP去除试剂和ADP检测试剂的体积保证为1: 1: 2。

4. 室温孵育40分钟，从而终止激酶反应并消耗剩余ATP。

激酶活性测定 (ADP检测)

1. 取出ADP检测试剂，平衡至室温。轻摇混匀。

2. 将50 μL的ADP检测试剂加入以上50 μL 96孔检测板中，或10 μL ADP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检测试剂后30-60分钟读取荧光信号。由于荧光信号非常稳定，根据实验需求，也可以在加入检测试剂后3小时内读板。

注意事项 (供参考)

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。