

## NBA-Glo™ Kinase ADP Assay

### NBA-Glo™ 激酶 ADP 检测试剂盒说明书

(L4000, L4001, L4002, L4003)

#### 一. 产品描述

NBA-Glo™ 激酶 ADP 检测试剂盒可以定量测定酶学实验中激酶的活性。该试剂盒通过定量检测激酶反应产物 ADP 的数量以确定激酶的活性：ADP 的数量和激酶活性呈正相关。使用 NBA-Glo™ 激酶 ADP 检测试剂盒时激酶反应中的 ATP 浓度最高可至 1mM。该试剂盒可以检测多数激酶，激酶底物包括多肽，蛋白，脂或糖等。该试剂盒可用于激酶抑制物的高通量均相筛选，并可以通过调整 ATP 浓度区分 ATP 竞争性和非竞争性抑制物。该试剂盒也可以用于检测任何产生 ADP 的酶的活性，例如 ATPase。

#### 二. 产品组成

NBA-Glo™ 激酶 ADP 检测试剂盒由 ATP 去除试剂和 ADP 检测试剂两部分组成，规格如下：

目录号	规格	96-孔板反应数	384-孔板反应数
L4000	ATP 去除试剂 2mL ADP 检测试剂 4ml	80	400
L4001	ATP 去除试剂 5mL ADP 检测试剂 10ml	200	1,000
L4002	ATP 去除试剂 50mL ADP 检测试剂 100ml	2,000	10,000
L4003	ATP 去除试剂 10x50mL ADP 检测试剂 10x100ml	20,000	100,000

#### 三. 实验步骤

##### 1. 激酶反应

- 1) 在 96 孔或 384 孔白不透明实验板中进行激酶反应。建议 96 孔板反应体积为 25 $\mu$ L，384 孔板反应体积为 5 $\mu$ L。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实验。由于 NBA-Glo™ 激酶 ADP 检测试剂盒的高度灵敏性，激酶用量可以极大降低。
- 3) **重要提示：** ATP 的浓度最高可至 1mM。一些市售 ATP 含有 ADP 残余，由于 NBA-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 所售 ATP, Cat# A2383 (纯度≥99%) 或其他更高纯度的 ATP。
- 4) 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 MgCl<sub>2</sub>)或采用文献报道的反应缓冲液和辅助因子。
- 5) 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，建议优化激酶反应于室温 (22°C-25°C) 进行，以利于在 NBA-Glo™ 激酶 ADP 检测，过程中保持实验板的温度均一性。
- 6) 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，避免使用镁离子螯合剂，例如 EDTA。NBA-Glo™ 激酶 ADP 检测中需要镁离子进行反应。

## 2. 激酶反应后 ATP 的去除

- 1) 取出 NBA-Glo™ 激酶 ATP 去除试剂，平衡至室温 (22°C-25°C)。轻摇混匀。
- 2) 如果激酶反应是在非室温，例如 30°C 进行反应的，平衡实验板至室温。
- 3) 加 25 μL 的 ATP 去除试剂到以上 25 μL 96-孔实验板中(总体积 50μL)，或 5 μL ATP 去除试剂到 5 μL 384-孔实验板中(总体积 10μL)。振荡混匀。
- 4) 室温孵育 40 分钟。

## 3. 激酶活性测定 (ADP 检测)

- 1) 取出 NBA-Glo™ 激酶 ADP 检测试剂，平衡至室温。轻摇混匀。(提示：ADP 检测试剂中的荧光素酶反应对温度变化敏感。试剂和实验板需要平衡到室温 (22°C-25°C)，测试过程温度保持恒定 (±1°C))
- 2) 加 50 μL 的 ADP 检测试剂到以上 50 μL 96-孔实验板中，或 10 μL ADP 检测试剂到以上 10 μL 384-孔实验板中，振荡混匀。室温暗处孵育 30 分钟。
- 3) 可以在加入 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，如有需要，可以在加入检测试剂后 3 小时内读板。

## 四. 运输和储存条件

干冰运输。-20°C 及以下避光储存，有效期 12 个月。

## 五. 注意事项

- 1) 非经严格验证, 不建议随意改变反应试剂用量。激酶反应, ATP 去除试剂和 ADP 检测试剂的体积比应为 1: 1: 2。
- 2) 首次使用试剂后应分装并于负 20°C 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 4 次信号强度无损失, 放置于室温 (22°C) 或 4°C 24hr 信号强度无损失。
- 3) 本产品仅作科研用途。