

NBA-Glo™ AMP Assay Kit

NBA-Glo™ AMP 检测试剂盒说明书

(L7001, L7002)

一. 产品描述

NBA-Glo™ AMP 检测试剂盒可以均相定量测定酶学实验中任何产生 AMP 的酶的活性，例如 cAMP-特异性磷酸二酯酶(PDE)，氨基酰-tRNA 合成酶，T4 DNA 连接酶和泛素连接酶的活性。该试剂盒通过定量检测酶反应产物 AMP 的数量以确定酶的活性：AMP 的数量和酶活性呈正相关，并且在酶反应中存在或不存在 ATP 的情况下，该试剂盒均可定量检测反应产生的 AMP。该试剂盒可用于产生 AMP 的酶，例如 PDE 的酶抑制物的高通量均相筛选。NBA-Glo™ AMP 检测试剂盒具有广泛的通用性，高检测灵敏度，检测动态范围大和不易受化合物干扰的优点。

二. 产品组成

NBA-Glo™ AMP 检测试剂盒由 AMP GR 试剂和 AMP 检测试剂两部分组成，并包括 ATP 和 AMP 试剂各一瓶。其中 AMP GR 试剂用于终止酶反应，同时去除 ATP，并将 AMP 转换成 ADP；AMP 检测试剂用于将 ADP 转换成 ATP，并通过萤光素酶和 ATP 的反应产生发光信号。试剂盒规格如下：

目录号	规格	96-孔板反应数	384-孔板反应数
L7001	AMP GR 试剂 5mL AMP 检测试剂 10ml ATP (10mM, 0.5mL) AMP (10mM, 0.1mL)	200	1,000
L7002	AMP GR 试剂 50mL AMP 检测试剂 100ml ATP (10mM, 5mL) AMP (10mM, 1mL)	2,000	10,000

三. 实验步骤

1. 酶反应实验设定：

- 1) 在 96 孔或 384 孔白不透明实验板中进行酶反应。建议 96 孔板反应体积为 25μL，384 孔板反应体积为 5μL。可以在酶反应中加入浓度梯度的测试化合物。

- 2) 酶和底物浓度需要根据不同的酶反应进行优化。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酶浓度进行实验。由于 NBA-Glo™ AMP 检测试剂盒的高度灵敏性，酶用量可以极大降低。
- 3) 如果酶反应需要 ATP，应使用高纯度的 ATP 以获得最优实验结果。一些市售 ATP 含有 ADP 残余，由于 NBA-Glo™ AMP 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，因此酶反应需使用高纯度的 ATP。可以使用试剂盒自带 ATP，或其他高纯度 ATP，例如 Sigma-Aldrich 所售 ATP (Cat# A2383, 纯度≥99%) 或其他更高纯度的 ATP。
- 4) 酶反应可以采用文献报道的反应缓冲液和辅助因子或根据特定实验设定优化后的条件。
- 5) 酶反应的温度和时间需根据不同的酶而设定。进行化合物高通量筛选实验时，建议优化酶反应于室温（22°C-25°C）进行，以利于在 NBA-Glo™ AMP 检测过程中保持实验板的温度均一性。
- 6) 酶反应结束后不需要加入额外试剂终止酶反应。如果因特殊实验要求需要加入酶反应终止试剂，避免使用镁离子螯合剂，例如 EDTA。NBA-Glo™ AMP 检测反应需要镁离子，最终镁离子的浓度必须至少为 5mM。

2. 酶反应后 AMP 到 ADP 的转化和 ATP 的去除

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

3. 酶活性测定

- 1) 取出 NBA-Glo™ AMP 检测试剂，平衡至室温。轻摇混匀【注 4】。
- 2) 加 50 μL 的 AMP 检测试剂到以上 50 μL 96-孔实验板中，或 10 μL AMP 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 AMP 检测试剂后 30-180 分钟或更长读取发光信号【注 6】。

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) 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。
- 2) 长期保存于 -20°C 的 NBA-Glo™ AMP 检测试剂解冻至室温后可能会有少许沉淀，可以直接使用上清试剂或离心去除沉淀后使用。
- 3) 不同批次不建议混用。

- 4) NBA-Glo™ AMP 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/实验板需要平衡到室温（22℃-25℃），测试过程温度保持恒定（±1℃）。
- 5) 非经验证，不建议改变反应试剂用量。酶反应，NBA-Glo™ AMP GR 试剂和 AMP 检测试剂的体积比应为 1: 1: 2。
- 6) 发光信号非常稳定，3hr 内信号强度基本不变。
- 7) 本产品仅作科研用途。