

# NBA-Glo™ Kinase ADP-Max Assay Kit

## NBA-Glo™ 激酶 ADP-Max 检测试剂盒说明书

(L4004, L4005)

### 一. 产品描述

NBA-Glo™ 激酶 ADP-Max 检测试剂盒可以定量测定酶学实验中任何产生 ADP 的酶的活性，例如激酶或 ATPase 的活性。该试剂盒通过定量检测酶反应产物 ADP 的数量以确定酶的活性：ADP 的数量和酶活性呈正相关。使用 NBA-Glo™ 激酶 ADP-Max 检测试剂盒时酶反应中的 ATP 浓度最高可至 5mM。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/ATPase 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，而实验中应用高浓度 ATP 可以使某些激酶或 ATPase 的反应条件更接近于其生理反应条件。NBA-Glo™ 激酶 ADP-Max 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™ 激酶 ADP-Max 检测试剂盒由 ATP Max 去除试剂和 ADP Max 检测试剂两部分组成，并包括 ATP 和 ADP 试剂各一瓶。其中 ATP Max 去除试剂用于终止酶反应，同时去除 ATP；ADP Max 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 |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------|----------|-----------|
| L4004 | ATP Max 去除试剂 5mL<br>ADP Max 检测试剂 10ml<br>ATP (100mM, 0.25mL)<br>ADP (10mM, 1mL)  | 200      | 1,000     |
| L4005 | ATP Max 去除试剂 50mL<br>ADP Max 检测试剂 100ml<br>ATP (100mM, 2.5mL)<br>ADP (10mM, 5mL) | 2,000    | 10,000    |

### 三. 实验步骤

#### 1. 酶反应实验设定：以激酶反应为例

- 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) 激酶和底物浓度需要根据不同的激酶反应进行优化。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激酶浓度进行实验。由于 NBA-Glo™ 激酶 ADP-Max 检测试剂盒的高度灵敏性, 激酶用量可以极大降低。
- 3) 激酶反应 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 NBA-Glo™ 激酶 ADP 检测试剂盒 (目录号 L4002) 以获得最优实验结果。一些市售 ATP 含有 ADP 残余, 由于 NBA-Glo™ 激酶 ADP-Max 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。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 $\geq$ 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-Max 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-Max 检测反应需要镁离子, 最终镁离子的浓度必须至少为 5mM。

## 2. 激酶反应后 ATP 的去除

- 1) 取出 NBA-Glo™ ATP Max 去除试剂, 平衡至室温 (22°C-25°C)。轻摇混匀【注 1 2 3】。
- 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【注 4】。
- 3) 加 25  $\mu$ L 的 ATP Max 去除试剂到以上 25  $\mu$ L 96-孔实验板中 (总体积 50 $\mu$ L), 或 5  $\mu$ L ATP Max 去除试剂到 5  $\mu$ L 384-孔实验板中 (总体积 10 $\mu$ L)。振荡混匀【注 5】。
- 4) 室温孵育 40 分钟。

## 3. 激酶活性测定 (ADP 检测)

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

#### 四. 运输和储存条件

干冰运输。-20℃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℃及以下避光储存，保证试剂的稳定性。NBA-Glo™ ATP Max 去除试剂和 ADP Max 检测试剂反复冻融 3 次信号强度和功能无损失，放置于 4℃ 3 天信号强度和功能无损失。
- 2) 长期保存于-20℃的 NBA-Glo™ ADP Max 检测试剂解冻至室温可能会有少许沉淀，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™ ADP Max 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。激酶反应，NBA-Glo™ ATP Max 去除试剂和 ADP Max 检测试剂的体积比应为 1: 1: 2。
- 6) 发光信号非常稳定，3hr 内信号强度下降<20%。
- 7) 本产品仅作科研用途。