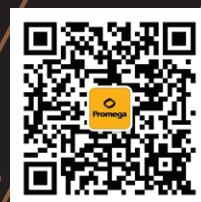


Kinases

Kinase Biochemical Activity Assay

激酶活性生化检测解决方案



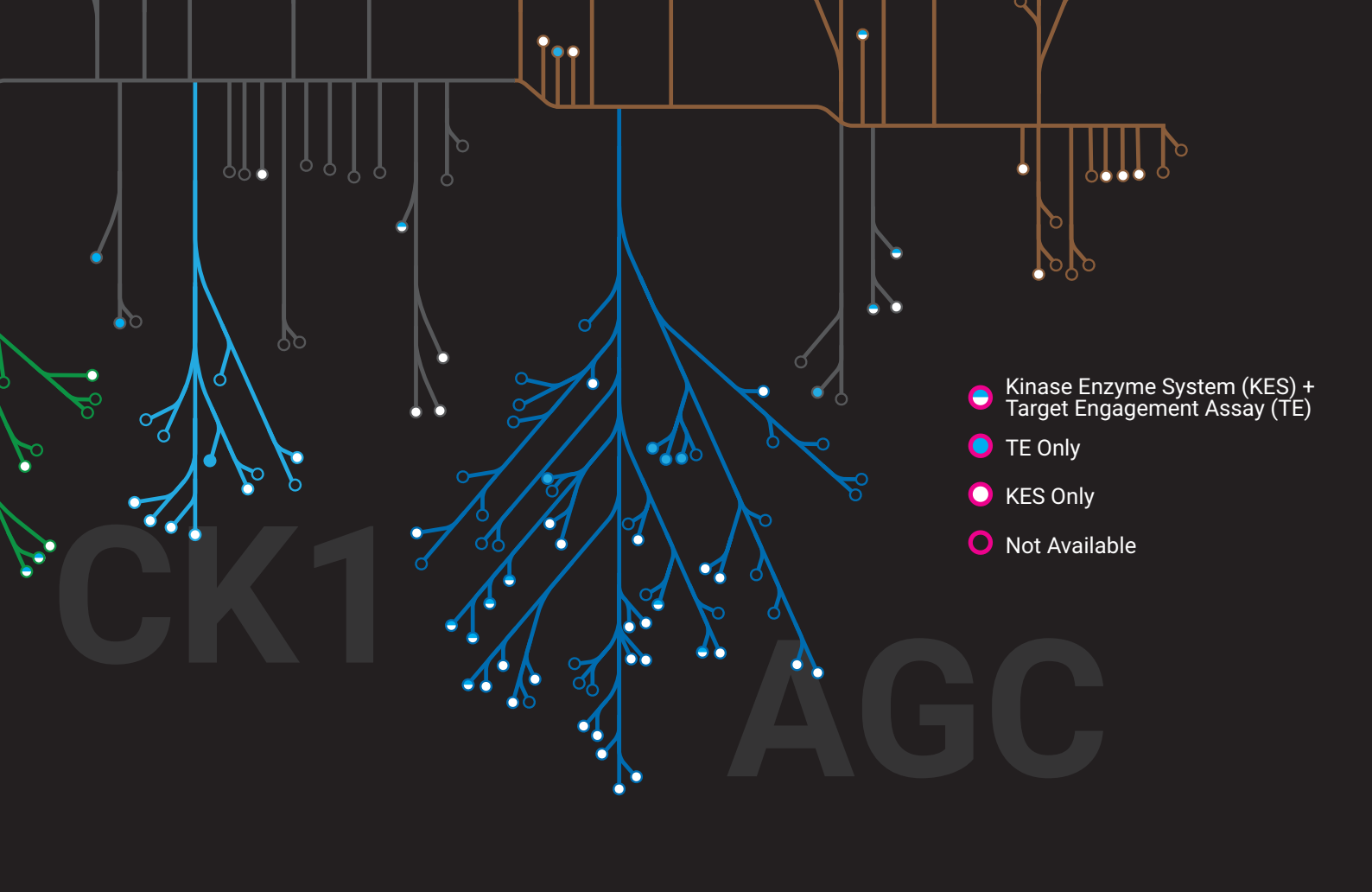
欢迎关注 Promega 官方微信



Kinase- 激酶

激酶功能失调已经被证实参与众多疾病进程，包括肿瘤，免疫系统疾病、炎症、退行性疾病、代谢性和心血管疾病，还有感染等。在过去的 30 年里，功能强大的激酶家族一直是重要的药物靶点。迄今为止有近几十个激酶抑制剂药物获批上市，其中以受体酪氨酸激酶 (RTK) 抑制剂为主。然而对现有激酶靶向药物的耐药的出现促使人们寻找新的靶点。Promega 作为药物研发技术的资深供应商，为您提供从激酶纯酶，到检测系统，从**生化检测法**到**细胞水平检测**，从试剂到仪器的全方位激酶药物研发解决方案。





目 录

1. 生化法激酶活性检测原理介绍及特点	4
2. 应用操作流程及数据展示	7
• 生化法激酶活性检测	8
• 激酶抑制剂筛选	9
• 激酶选择性 Profiling	11
3. 相关资源	14

基于 ADP 检测的生化水平 激酶活性检测解决方案



应用 Promega 专利的生物发光检测技术，提供基于检测纯化激酶反应中产生的 ADP 来进行体外激酶活性检测和相关药物研发的解决方案。此平台动态范围宽，灵敏度高，几乎可用于任何以 ADP 为产物的酶活检测。**ADP-Glo™ Kinase Assay** 是 Promega 的金牌药物筛选技术之一。在全球顶尖的各大制药企业中得到广泛认可和使用。

应用：

- 激酶活性检测 (定量, 定性)

- 激酶药物筛选与 Profiling

- ATPase 活性检测

完整激酶检测解

1 激酶系统 379 kinases

Promega 提供 379 种人类激酶系统，包含 100 多个突变型。每个激酶系统包含激酶，底物和为 ADP-Glo™ 检测系统优化的反应缓冲液。同时激酶系统有 8 连管的形式，适用于进行 profiling。所有激酶系统都有详细的操作指导。

可扫描右侧二维码查询产品列表。电子版请点击[此处查询](#)。



2 激酶 Profiling 系统 1536 Well format compatible

组分：每个系统包含激酶和底物组合，分别按顺序预置于 8 连管内，以特定浓度的储存液形式提供。每个分析系统包含完成分析所需的组分混合物，包括激酶反应缓冲液、位于 8 连管内的 8 种激酶、位于其他 8 连管内的 8 种相应底物和辅因子。

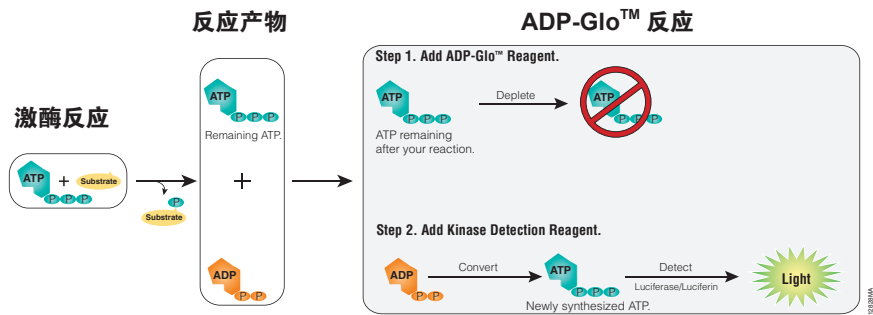
产品模式：将激酶分成两种方式提供，单独激酶家族 8 连管组或者激酶家族 8 连管加检测试剂。

查询详细产品列表请扫描右侧二维码，电子版请点击[此处链接](#)。



激酶家族	激酶系统	激酶系统 +ADP-Glo™ Assay 检测试剂
	目录号	目录号
AGC-1	V6858	V6859
AGC-2	V6910	V6931
CAMK-1	V6932	V6913
CAMK-2	V6924	V6925
CMGC-1	V6854	V6855
CMGC-2	V6856	V6857
STE-1	V6916	V6917
TK-1	V6850	V6851
TK-2	V6852	V6853
TK-3	V6920	V6921
TK-4	V6922	V6923
TKL-1	V6914	V6915
Other/CK-1	V6918	V6919
Other-2	V6926	V6927
General Panel	V6928	V6929
Class I PI3Ks	V1721,V1731,V1741,V1751,V1761, V1771	V1690

检测原理:



特点:

- **通用:** 几乎适用于任何产物为 ADP 的酶的检测, 包括各种蛋白激酶, 非经典激酶, 如脂类激酶, 鞘磷脂激酶及己糖激酶。
- **灵敏度高:** 接近放射性方法, 更加节约成本。
- **适用于高通量操作:** 可应用于 384-1536 孔板的高通量操作平台。
- **适用的 ATP 浓度范围更宽:** ADP-Glo™ Kinase Assay 的 ATP 适用范围高达 1mM, ADP-Glo™ Max Assay 适用范围高达 5mM 。
- **更丰富的技术资料支持:** 有针对多个激酶的详细操作说明和反应条件数据。减少自行摸索实验条件消耗的时间。

决 方 案 产 品 列 表

3 激酶活性检测系统

ADP

Detection based

ADP-Glo™ Kinase Assay 和 ADP-Glo™ Max Assay 是发光法激酶检测试剂盒, 检测激酶反应中所形成的 ADP, 光信号与激酶活性成正比。几乎可检测任何可生成 ADP 的酶的活性, ADP-Glo™ Kinase Assay 的 ATP 适用范围高达 1mM, ADP-Glo™ Max Assay 适用范围高达 5mM 。

现在已经在全球各大制药公司中被广泛使用。

产品	规格 (384 孔板模式计算)	目录号
ADP-Glo™ Kinase Assay	400 assays	V6930
	1,000 assays	V9101
	10,000 assays	V9102
	10X10,000 assays	V9103
	100,000 assays	V9104
ADP-Glo™ Max Assay	1,000 assays	V7001
	10,000 assays	V7002

Note: 检测通量不同, 产品规格计算不同。上表以 384 孔板检测模式计算。

4 高通量检测仪器

10⁹

Linear Range



GloMax® Discover 是 Promega 推出的新型多功能读板仪。制作工艺精良, 性能出众, 拥有发光, 荧光及比色等多种检测功能。拥有卓越的灵敏度和动态范围, 仪器提供灵活的滤光片选择。

检测功能: 滤光片式化学发光、荧光、紫外 - 可见光吸光度、生物发光共振能量转移 (BRET) 和荧光共振能量转移 (FRET) 检测。仪器具有振荡和加热功能。

检测模式: 6, 12, 24, 48, 96 和 384 孔板。

硬件配置: 仪器整合了平板电脑, 提供更方便快捷的操控体验。

软件配置: 操作软件预设了 Promega 发光检测试剂盒操作程序。

产品详细信息请扫描右侧二维码, 电子版资料请直接点击[此处链接](#)。



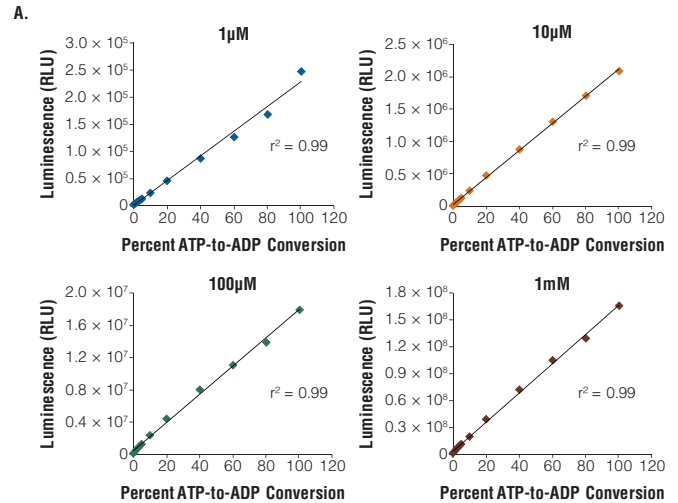
检测系统基本性能

- 灵敏度高，线性范围宽：ATP 适用范围高达 1mM。

右图 . ADP-Glo™ Kinase Assay 的灵敏度和线性。

图 A. 4 个 ATP to ADP 转化曲线以指定的浓度在 25ul 的 1X reaction buffer A 中进行，96 孔板模式。ADP-Glo™ Kinase Assays 检测以 25ul ADP-Glo™ Reagent 和 50ul Kinase Detection Reagent 在室温中进行。以 GloMax® 读板仪检测光信号。数据代表 2 个复孔的平均值。光信号与 ADP 的量呈线性相关。

图 B. 图中信噪比数据显示出了 ADP-Glo™ Kinase Assay 具有高度灵敏。ADP-Glo™ Kinase Assay 发光信号在加入 Kinase Detection Reagent 后，1 小时后检测。为了确定信号的稳定性，每小时记录一次发光信号。信号在 5 小时内稳定，3 小时后信号增加 <20%，而信号与背景比没有变化（未显示数据）。RLU= 相对光单位。



B.

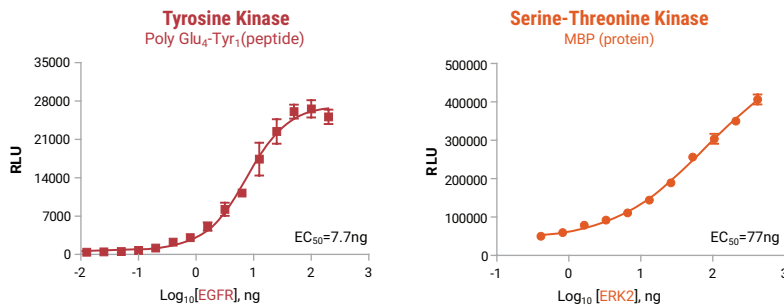
Signal-to-Background Ratios

Percent ADP in an ATP + ADP Mixture

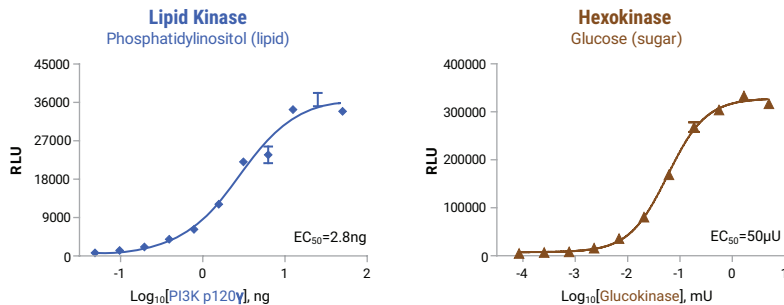
	100	80	60	40	20	10	5	4	3	2	1	0
1μM	80	54	41	28	15	8	4	4	3	2	2	1
10μM	135	110	84	57	31	16	8	7	6	4	2	1
100μM	125	97	77	56	31	17	9	8	6	5	3	1
1mM	117	91	74	51	28	14	8	7	6	4	2	1

- 通用：几乎适用于任何产物为 ADP 的酶的检测，包括各种蛋白激酶，非经典激酶，如脂类激酶，鞘磷脂激酶及己糖激酶。

蛋白激酶 Protein Kinases

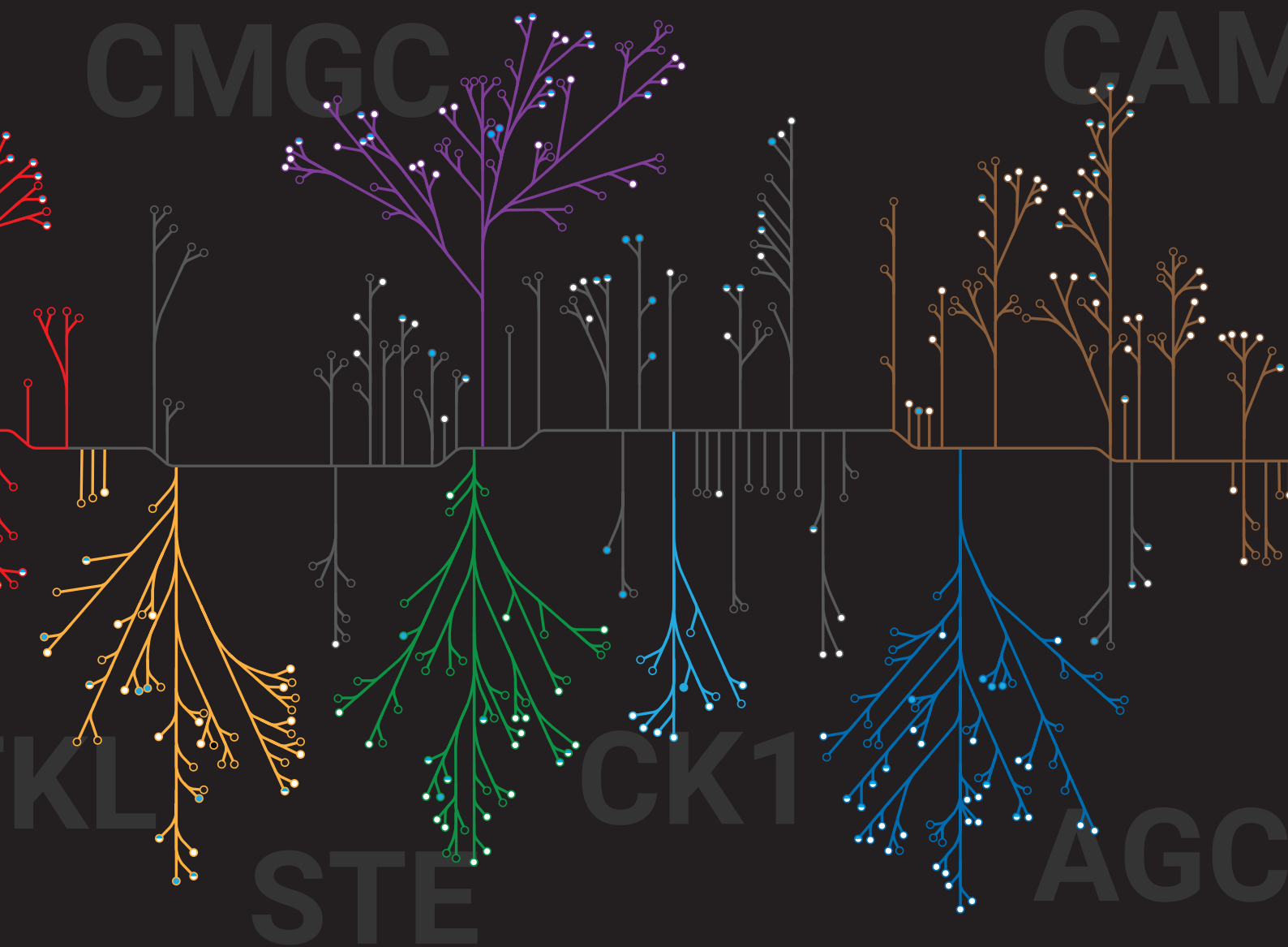


非经典激酶 Non-classical Kinases



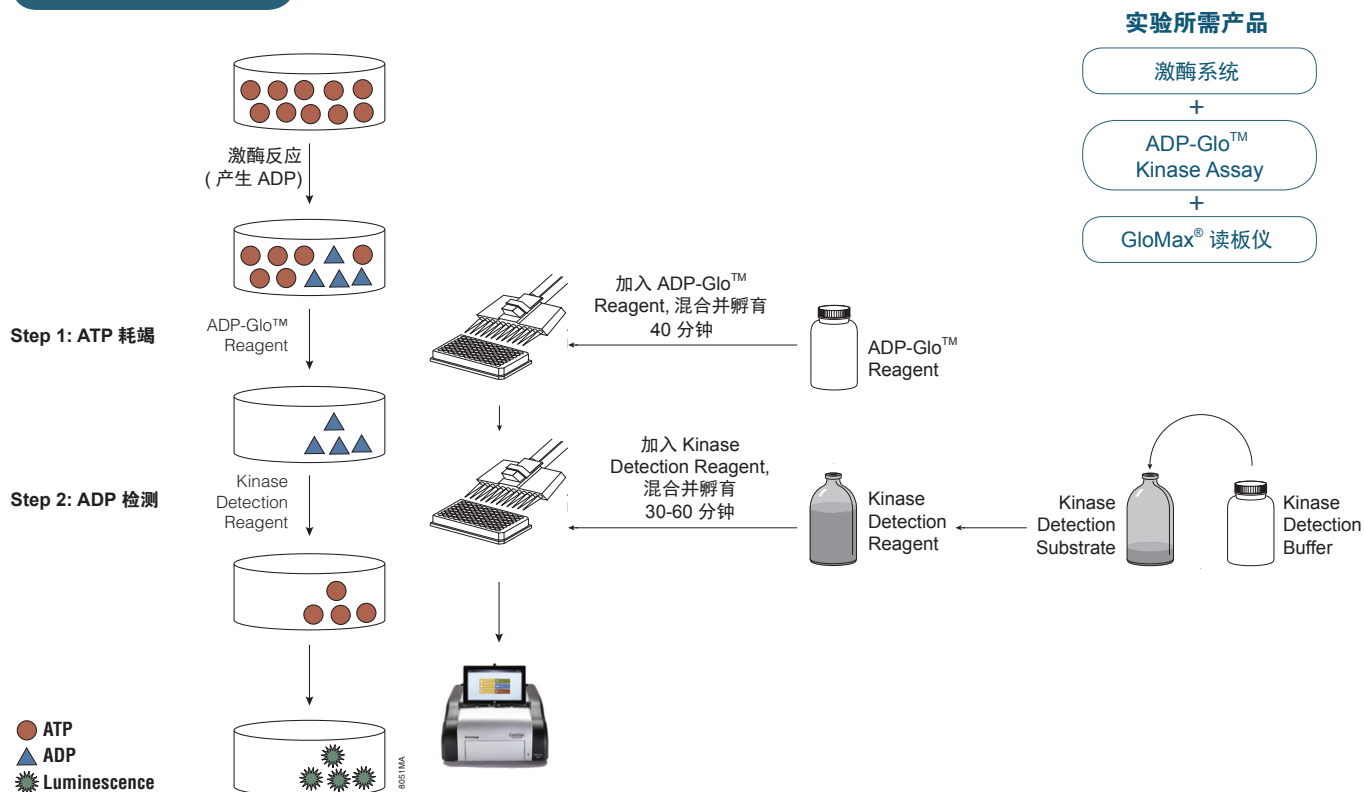
应用操作流程及数据展示

Protocol and Result



1 激酶活性检测简要操作流程及数据展示

流程示意图



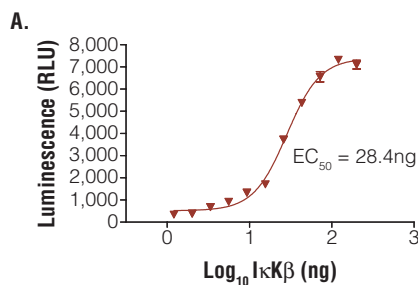
数据展示

使用 IKK β 激酶展示 ADP-Glo™ Kinase Assay 性能。

图 A. 在 384 孔板进行 10 μ l 激酶反应，反应缓冲液 A 含有 2mM MnCl₂，2mM DTT 和 100 μ M 钒酸钠，底物为 200 μ M 的 IkKtide peptide，还有 1 μ M ATP，在室温反应 1 小时，以 10 μ l ADP-Glo™ 试剂和 20 μ l Kinase Detection Reagent 检测 ADP。

图 B. ATP-to-ADP 转化曲线，1 μ M 梯度稀释，将产生的 ADP% 与每个 RLU 值相关联。

图 C. 少量的酶也可以 (少于 EC₅₀) 产生高信噪比 (S:B Ratio)。数据是复孔的平均值。SB5、SB10 和 SB20 分别定义为达到 5、10 和 20 倍信噪比所需的酶量。



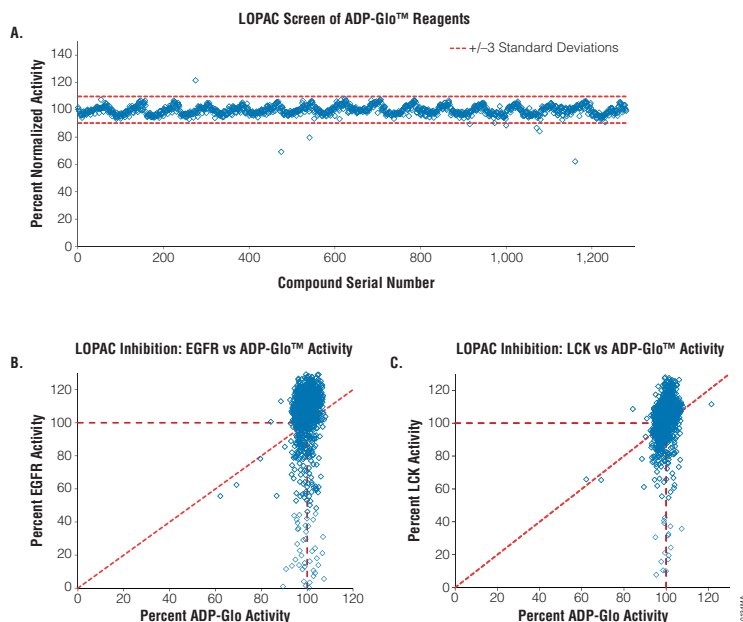
B.

IKK β (ng/reaction)	200	120	72	43.2	25.9	15.6	9.3	5.6	3.4	2.0	1.2	0
Average RLU	7,104	7,325	6,558	5,375	3,723	1,705	1,330	917	678	383	339	148
% ADP Produced	35.0	36.2	32.3	25.7	17.6	8.1	6.0	3.6	2.4	1.4	1.1	0
S:B Ratio	48.0	49.5	44.3	36.3	25.2	11.5	9.0	6.2	4.6	2.6	2.3	1

C.

	SB ₅	SB ₁₀	SB ₂₀
IKK β (ng)	5.16	13.5	20.5

数据展示



激酶抑制剂 LOPAC 文库的筛选及对 ADP-Glo™ 激酶活性测定。

在 384 孔板（共 16 个板）中以 10mM 浓度（最终浓度为 10 μ M）加入 5nl 的 LOPAC 化合物库 1280 种化合物，每种 4 个复孔。

A 图 . LOPAC 化合物对 ADP-Glo™ 试剂的影响的检测是在 ADP 浓度为 20% 的 ADP-ATP 混合溶液 (30 μ M 浓度) 中进行 (不存在激酶)。30 μ M ATP 作为 0% 活性作为对照，用于每个化合物结果的归一化。

B 图 . LOPAC 抑制 EGFR 激酶 (Cat.#V3831) 与 ADP-Glo™ 活性的关系。

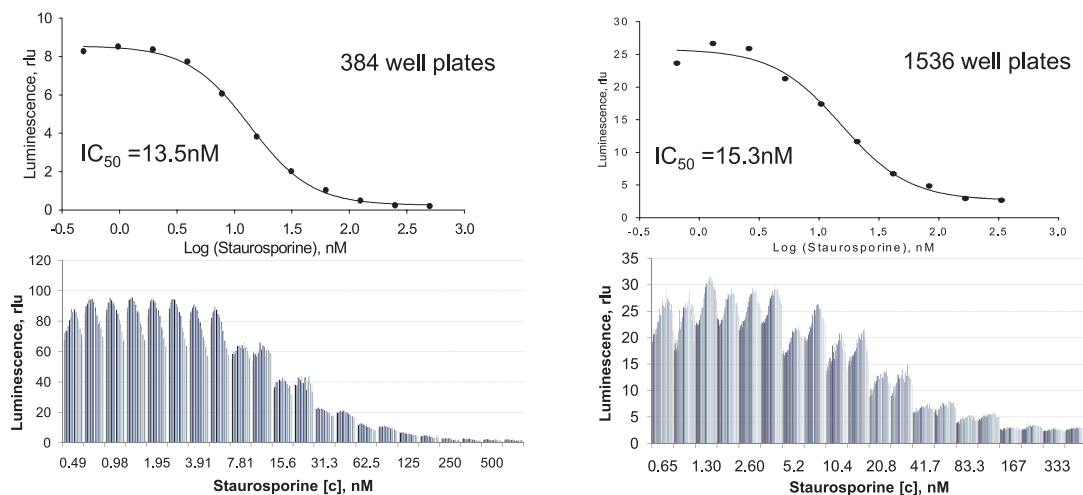
C 图 . LOPAC 抑制 LCK 激酶 (Cat.#V2691) 与 ADP-Glo™ 活性的关系。两种激酶反应均在含有 50 μ M DTT 和 2mM MnCl₂ 的 1X 反应缓冲液 A 中进行，细节详见各自的说明书，但以下例外：2.5 μ l 的激酶溶液先加入到已加好的化合物的平板中并孵育 20 分钟，然后加入 ATP/ 底物溶液来启动反应。EGFR 反应含 0.2 μ g/ μ l Poly 4Y1 (Glu4, Tyr1) 底物，3.75ng 酶和 5 μ M ATP。LCK 反应含 0.2 μ g/ μ l Poly4Y1 (Glu4, Tyr1) 底物，1.5ng 酶和 30 μ M ATP。两种反应均孵育 60 分钟。阳性对照不含化合物，用于计算 100% 激酶活性。阴性对照不含化合物也不含酶，用于计算 0% 激酶活性。

更多信息 [浏览此处](#)。

数据展示

性能强劲稳定——可用于高达 1536 孔板的高通量筛选

不同浓度 Staurosporine 对 cAMP - Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit 活性影响。针对每个抑制剂浓度，收集 48 或 96 个数据点信息，以评估 ADP-Glo™ Kinase assay 在高通量筛选中的性能。更多信息请[浏览此处](#)。



2 激酶 Profiling 简要操作流程及数据展示

Promega 提供专门用于激酶 Profiling 的即用型产品，将数天才能完成的检测缩短到几小时内。节约时间和人力，并为获得更可信结果提供保证。

组分：每个系统包含激酶和底物组合，分别按顺序预置于 8 连管内，以特定浓度的储存液形式提供。每个分析系统包含完成分析所需的组分混合物，包括激酶反应缓冲液、位于 8 连管内的 8 种激酶、位于其他 8 连管内的 8 种相应底物和辅因子。

产品模式：Kinase Selectivity Profiling Systems 将激酶分成两种方式提供，单个激酶家族 8 连管组或者人类激酶组用于广谱激酶分析的通用 8 连管组。

激酶 Profiling 系统特点

- Promega 可提供包括脂酶在内的 16 个激酶家族的 Profiling 系统。
- 预装试剂的 8 连管可同时检测 8 个激酶。
- 在 10 μ M ATP 中分析时，为所有的激酶优化，可提供 10-30% ADP 产率。
- 发光信号稳定，可进行批量处理。
- 真实反映激酶活性，与放射性分析获得的 IC₅₀ 值相当。

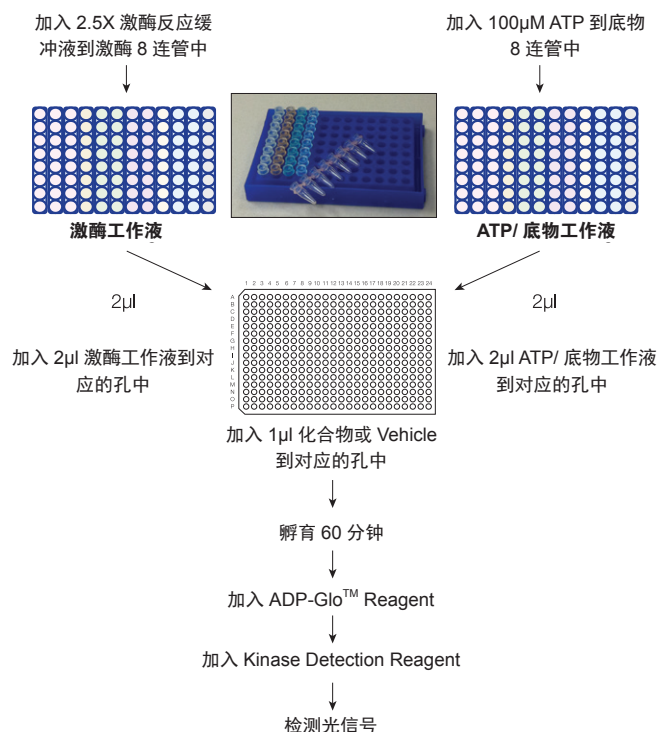
TK-1

EGFR	Poly (E,Y)
HER2	Poly (E,Y)
HER4	Poly (E,Y)
IGF1R	IGF1Rtide
InsR	Axltide
KDR	Poly (E,Y)
PDGFRa	Poly (E,Y)
PDGFRb	Poly (E,Y)

上图举例说明选择性 profiling 激酶系统结构，激酶（左）和底物（右）分别位于 8-连管中顺序排列。方便根据不同的药物分析需求选择对应系统。

激酶 Profiling 简要操作流程示意图

在 8 连管中稀释激酶和底物 / 辅因子高浓度储存液，后加入 2 μ l 激酶、底物和 1 μ l 化合物到 384-孔板中。孵育 1 小时后，进行 ADP-Glo™ Assay 检测，发光信号值正比于 ADP 浓度和激酶活性。自动化 Profiling 视频演示。



化合物激酶 Profiling 实验所需产品

激酶 Profiling 系统

+

化合物

+

ADP-Glo™ Kinase Assay

+

GloMax® 读板仪

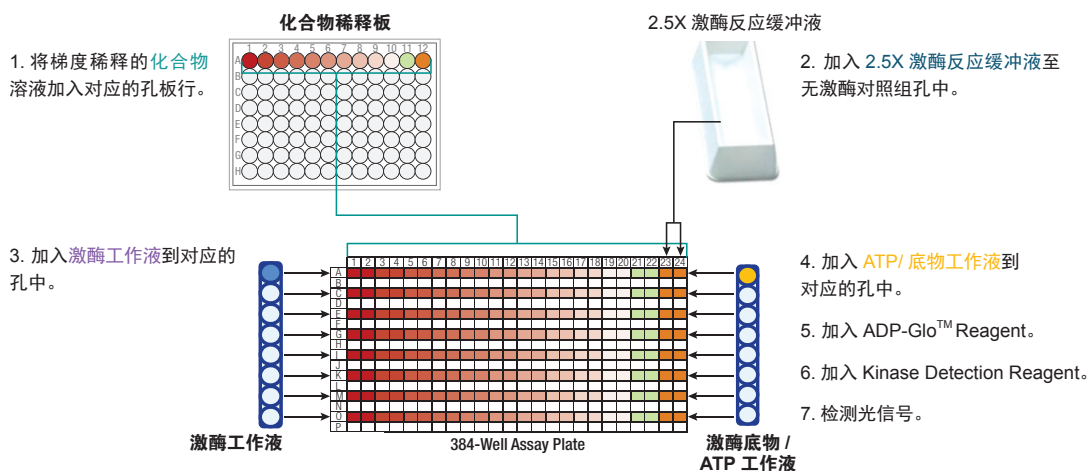
激酶家族	激酶系统	激酶系统 + ADP-Glo™ Assay 检测试剂
	目录号	目录号
AGC-1	V6858	V6859
AGC-2	V6910	V6931
CAMK-1	V6932	V6913
CAMK-2	V6924	V6925
CMGC-1	V6854	V6855
CMGC-2	V6856	V6857
STE-1	V6916	V6917
TK-1	V6850	V6851
TK-2	V6852	V6853
TK-3	V6920	V6921
TK-4	V6922	V6923
TKL-1	V6914	V6915
Other/CK-1	V6918	V6919
Other-2	V6926	V6927
General Panel	V6928	V6929
Class I PI3Ks	V1721,V1731,V1741,V1751,V1761, V1771	V1690

3 激酶抑制剂研发简要操作流程及数据展示

化合物进行激酶 Profiling 有两种实验方案，化合物量效曲线制备 (Compound Dose-Response Curve) 和单剂量抑制剂 profile(Single-Dose Inhibition Profile)。下面是 2 种实验方案的流程示意图，详细流程及试剂制备见 Kinase Selectivity Profiling System 说明书。

实验所需产品 激酶 Selectivity Profiling 系统 + 化合物 + ADP-Glo™ Kinase Assay + GloMax® 读板仪

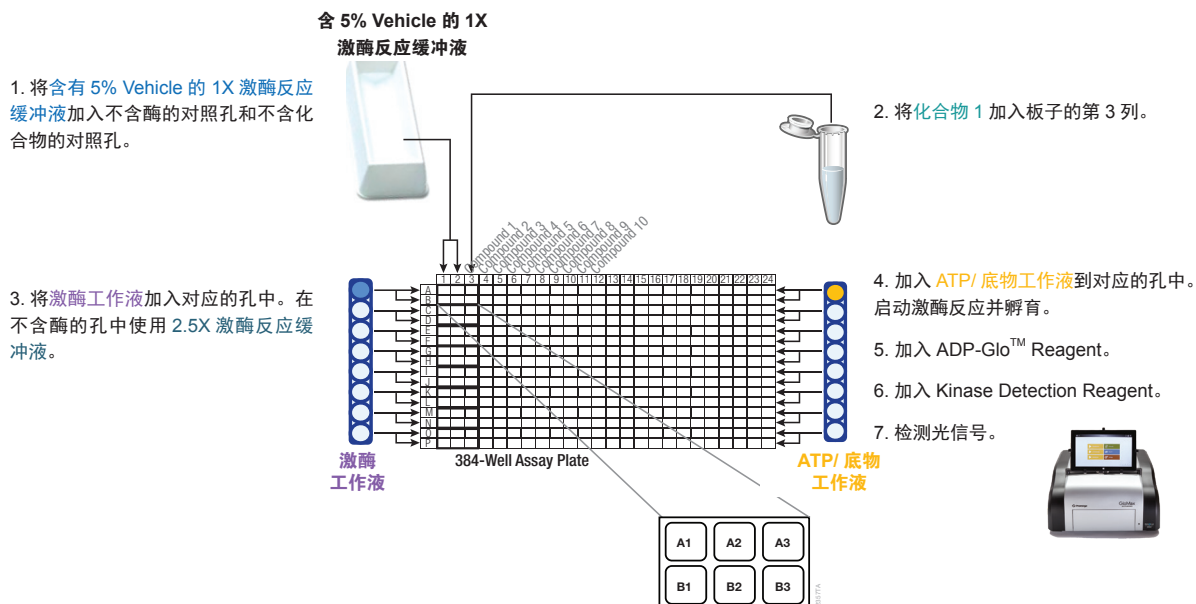
化合物量效曲线制备简要流程示意图



单剂量抑制剂 Profile 简要流程示意图

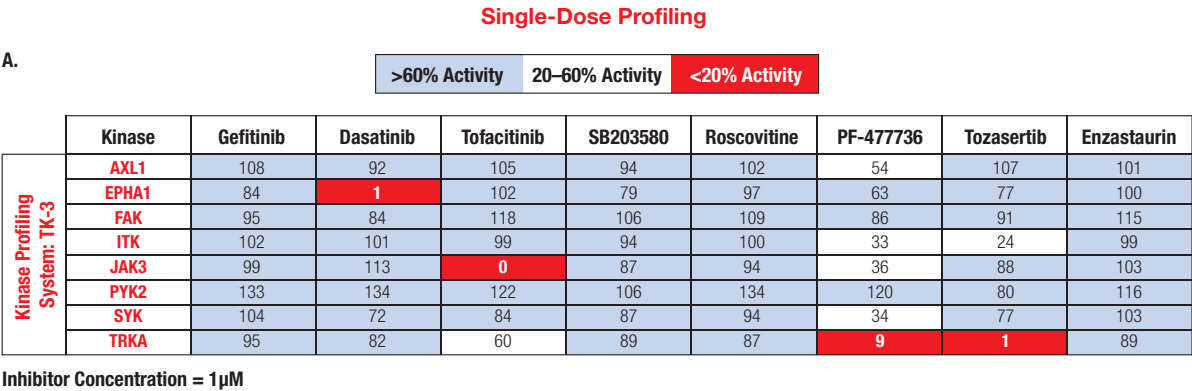
Single-Point Assay 的激酶反应的孔板布局

- 无激酶的反应对照组 -A1 和 B1 孔：含 5% Vehicle 的 1X 激酶反应缓冲液 +2.5X 激酶反应缓冲液 +ATP/底物工作液。
- 无化合物的反应对照组 -A2 和 B2 孔：含 5% Vehicle 的 1X 激酶反应缓冲液 + 激酶工作液 +ATP/底物工作液。
- 激酶和化合物反应组 -A3 和 B3：化合物 1+ 激酶工作液 +ATP/底物工作液。



数据展示

- 使用 Kinase Selectivity Profiling System 进行抑制剂单剂量 Profiling 分析。



上图. 使用 Kinase Selectivity Profiling System 进行 8 种化合物的单剂量抑制剂 profiling: 使用 384 孔板, TK-3 Kinase selectivity assays, 反应体系为 1µl 化合物 (1µM 终浓度), 2µl 激酶工作液, 2µl 对应的 ATP/ 底物工作液。激酶活性以 ADP-Glo™ Kinase Assay 检测。数据显示了每种化合物处理后每种激酶的活性百分比。 Kinase Selectivity Profiling System 不仅适用于一级和二级筛选, 也适用于使用单一平台以经济高效的方式分析化合物。

- 使用 Kinase Selectivity Profiling System: TK-3 进行抑制剂剂量效曲线分析。

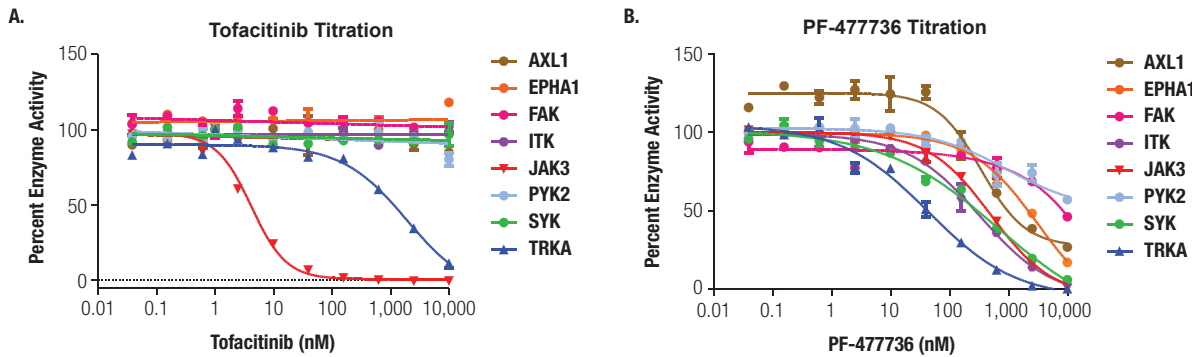


图 A. 选择性 JAK3 抑制剂 tofacitinib。图 B. 非选择性抑制剂 PF-477736。

C.

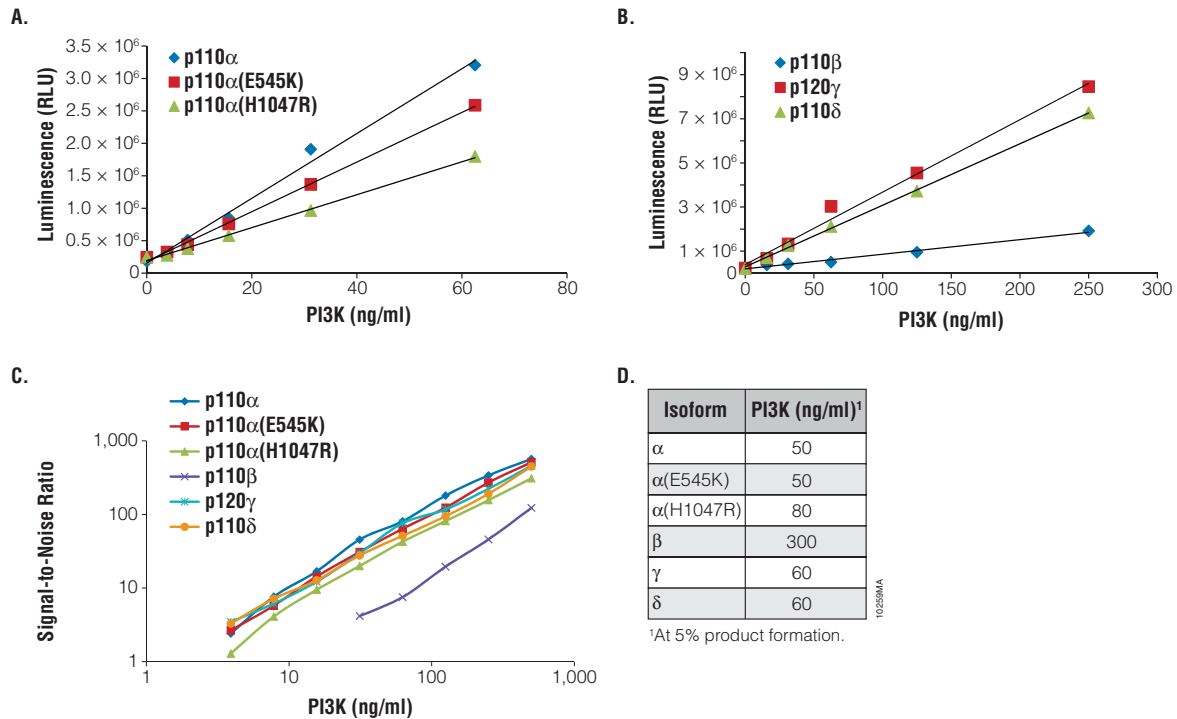
Kinase	IC ₅₀ Values from Tofacitinib Titration	IC ₅₀ Values from PF-477736 Titration
AXL1	NC	341nM
EPHA1	NC	3.2nM
FAK	NC	NC
ITK	NC	326nM
JAK3	4.2nM	496nM
PYK2	NC	967nM
SYK	NC	673nM
TRKA	1.9µM	43nM

图 A 为 TK-3 激酶选择性 JAK3 抑制剂 Tofacitinib, 图 B 为非选择性抑制剂 PF-477736。反应体系为 1µl 化合物, 2µl 激酶工作液和 2µl 对应的 ATP/ 底物工作液。激酶活性以 ADP-Glo™ Kinase Assay 检测。数据显示了每种化合物处理后每种激酶的活性百分比。以 sigmoidal 量效 (可变速率) 方程进行曲线拟合, IC₅₀(图 C) 以 Kinase Selectivity Profiling Systems (KPS) Dose-Response SMART Protocol 计算。

NC = not calculated.

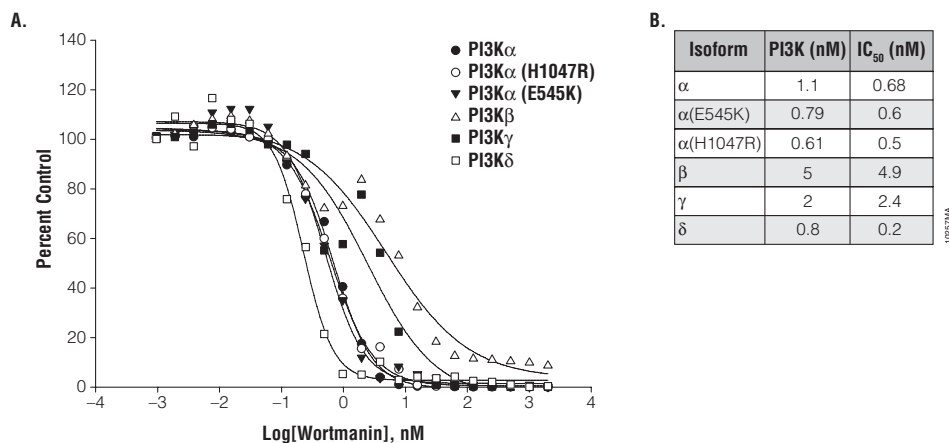
数据展示

脂类激酶梯度稀释曲线



上图. 脂类激酶梯度稀释曲线实验在 96 孔板进行, 反应总体积为 25 μ l, 反应体系为 PI3K 激酶反应缓冲液, 25 μ M ATP 终浓度, 0.05mg/ml PIP2:3PS 底物。反应在 23 $^{\circ}$ C 进行 1 小时。图 A 和图 B 显示酶浓度曲线的代表性数据。每个数据点代表四个样本的平均值 $\pm$ 标准偏差。图 C 显示了反应的灵敏度和线性范围。图 D 显示了 5% 产物形成所需的酶量。因为反应是在初始速率条件下进行的, 这代表了建立抑制剂筛选的最佳分析窗口, Z' 值高。

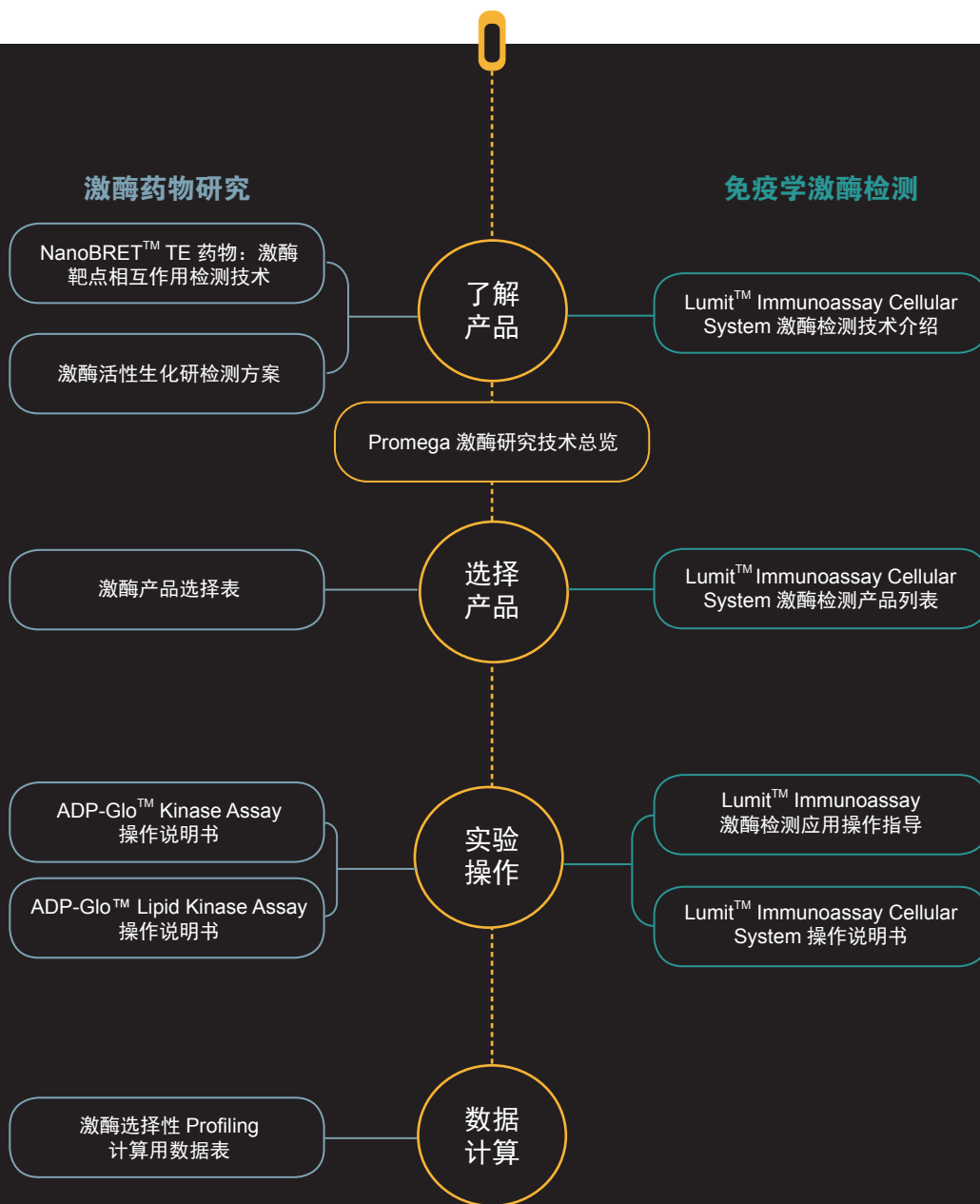
PI3K 抑制剂效价数据举例



上图. PI3K 抑制剂效价数据举例。IC₅₀ 值按照说明书中描述的方法计算。无酶 (背景值) 对照组的数值从所有数据点中减去, 在没有抑制剂的情况下 (100% 活性) 计算抑制率百分比。使用 SigmaPlot 9.0 软件提供的 sigmoidal 剂量反应可变斜率模型绘制数据, 如图 A 所示。图 B 显示了反应中使用的酶的数量以及不同 I 类 PI3K 异构体的计算 IC₅₀ 值。

激酶研究技术相关资源

扫描右侧链接获取下方资源



CMGC

基于 ATP 检测的其他激酶活性检测系统

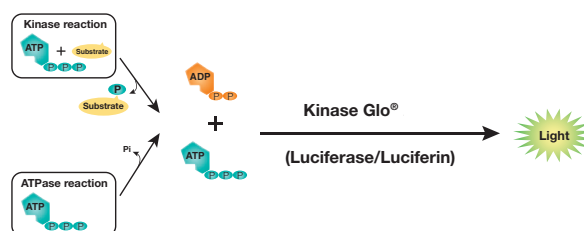
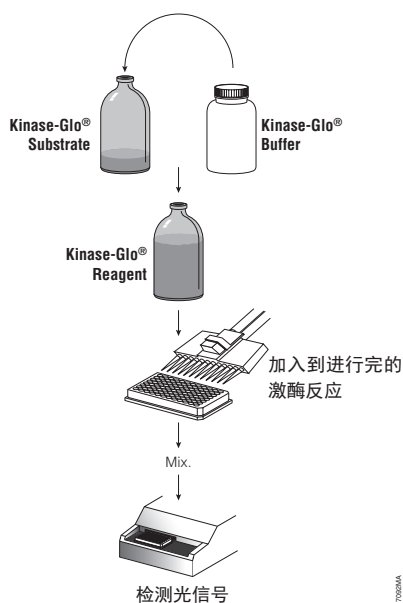
Kinase-Glo® Luminescent Kinase Assays

Kinase-Glo® Luminescent Kinase Assays 是一种均质的非放射性的方法，用于检测激酶反应后溶液中 ATP 的剩余含量来定量地检测纯化激酶的活性。此试剂盒为多孔板检测模式而设计，是自动化高通量筛选 (HTS) 的理想选择，可被用于检测蛋白质、脂质和糖激酶。整个操作过程只需在激酶的完全反应中加入单一的溶液即可。溶液加入后会产生与 ATP 含量相关的发光信号，而该信号的强弱与激酶的活力成反比。Kinase-Glo® 试剂盒产生的“辉光型”发光信号是由独有的萤光素酶和独有的缓冲液系统产生的。当在检测时存在激酶反应缓冲液（如 PKA 的反应缓冲液）的情况下，其发光信号的半衰期超过 5 个小时，因此不需带有进样器的发光检测仪，可以直接进行批量处理。该试剂盒无论在 96 孔板还是 384 孔板分析时都有非常好的 Z' 值（通常高于 0.7），可以很容易检测到已知的激酶抑制剂，并且产生的 IC₅₀ 值与文献所报道的相当。

检测原理

ATP 是激酶反应的必需组分，激酶反应过程中会消耗 ATP。在激酶反应结束后，加入 Kinase-Glo® 试剂，剩余的 ATP 将于试剂中的萤光素酶和底物反应，而产生光信号，而该信号的强弱与激酶的活力成反比。

检测流程



产品列表

产品	规格	目录号
Kinase-Glo® Luminescent Kinase Assay	10ml	V6711
	10 × 10ml	V6712
	100ml	V6713
	10 × 100ml	V6714
Kinase-Glo® Plus Luminescent Kinase Assay	10ml	V3771
	10 × 10ml	V3772
	100ml	V3773
	10 × 100ml	V3774
Kinase-Glo® Max Luminescent Kinase Assay	10ml	V6071
	10X10ml	V6072
	100ml	V6073
	10X100ml	V6074

联系
Promega



Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd
普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司

地址: 北京市东城区北三环东路 36 号环球贸易中心 B 座 907-909

电话: 010-58256268

网址: www.promega.com

微网站: wechat.promega.com.cn/

技术支持电话: 400 810 8133(手机拨打)

技术支持邮箱: chinatechserv@promega.com