

辉光型激酶活性检测试剂盒说明书

(K4301, K4302, K4303, K4304)

一、产品描述

Lumi-Glow™ 辉光型激酶活性检测试剂盒采用均质，简单的非放射性方法，通过检测激酶反应完全后溶液中剩余的 ATP 含量来定量检测待测激酶的活性。整个反应只需在激酶反应结束后加入单一的检测试剂即可，检测试剂加入后会产生与体系中 ATP 含量相应的发光信号，而体系中激酶活性的强弱与该信号成反比。基于荧光素酶发光检测系统的高灵敏度，该方法可用于分析蛋白质，脂质和糖激酶。体系所产生的荧光信号半衰期超过 2 小时，使该产品尤其适合高通量的化合物筛选。

二、产品组成

荧光素酶，荧光素，缓冲液混合后灌装于 10 ml 或 100 ml 的棕色瓶中，四种规格如下表所示：

目录号	规格	可检测的 96-孔板孔数	可检测的 384-孔板孔数
K4301	10 ml	200	1,000
K4302	10X10 ml	2,000	10,000
K4303	100 ml	2,000	10,000
K4304	10X100 ml	20,000	100,000

三、实验步骤

激酶反应条件的优化

为了使 Lumi-Glow™ 辉光型激酶活性检测试剂得到最佳反应性能，建议首先优化激酶反应条件，包括 ATP，激酶和激酶底物的量。对于 96 孔板，我们建议在 50 μ l 激酶反应体系中加入 50 μ l Lumi-Glow™ 检测试剂组成 100 μ l 总反应体系。对于 384 孔板，建议在 10 μ l 激酶反应体系中加入 10 μ l Lumi-Glow™ 检测试剂组成 20 μ l 总反应体系。对于其他反应体系，确保激酶反应液与 Lumi-Glow™ 检测试剂使用量 1:1。

• ATP 浓度的优化

1.1 使用激酶反应缓冲液 2 倍梯度稀释 ATP，加入到微孔板中，加入足量的激酶和激酶底物。另稀释相同浓度的 ATP，不加激酶或激酶底物作为对照组，充分混匀，室温孵育适当的时间。

注意：如果激酶反应不在室温下进行，在加入 Lumi-Glow™ 检测试剂之前需将微孔板平衡到室温。

1.2 加入与激酶反应体系等体积的 Lumi-Glow™ 辉光型激酶活性检测试剂，充分混匀。

1.3 室温避光反应 10 min，在 luminescence 读板仪上记录发光信号。

• 激酶底物浓度的优化

2.1 使用激酶反应缓冲液 2 倍梯度稀释激酶底物，加入足量的激酶和优化的 ATP 量。另稀释相同浓度的激酶底物，不加激酶作为对照组，充分混匀，室温孵育适当的时间。

注意：如果激酶反应不在室温下进行，在加入 Lumi-Glow™ 检测试剂之前需将微孔板平衡到室温。

2.2 加入与激酶反应体系等体积的 Lumi-Glow™ 辉光型激酶活性检测试剂，充分混匀。

2.3 室温避光反应 10 min，在 luminescence 读板仪上记录发光信号。

• 激酶浓度的优化

3.1 使用激酶缓冲液 2 倍梯度稀释激酶，加入优化的 ATP 和激酶底物量，充分混匀，室温孵育适当的时间。

注意：如果激酶反应不在室温下进行，在加入 Lumi-Glow™ 检测试剂之前需将微孔板平衡到室温。

3.2 加入与激酶反应体系等体积的 Lumi-Glow™ 辉光型激酶活性检测试剂，充分混匀。

3.3 室温避光反应 10 min，在 luminescence 读板仪上记录发光信号。

操作步骤（以 96 孔板为例）

1. 使用优化的 ATP，激酶和激酶底物浓度，与激酶反应缓冲液组成 50 μ l 激酶反应体系，加入到 96 孔板中，混合均匀，室温反应适当的时间，使激酶能充分消耗 ATP。

注意：如果激酶反应不在室温下进行，在加入 Lumi-Glow™ 检测试剂之前需将微孔板平衡到室温。

2. 每孔加入 50 μ l 的 Lumi-Glow™ 辉光型激酶活性检测试剂，充分混匀。

3. 室温避光反应 10 min，在 luminescence 读板仪上记录发光信号。

四、储存条件

储存 Lumi-Glow™ 辉光型激酶活性检测试剂盒于 -20℃，本品可耐受超过 10 次的冻融。

Lumi-Glow™ Luminescent Kinase Assay System

(K4301, K4302, K4303, K4304)

Description

Lumi-Glow™ luminescent kinase assay system is the homogeneous ready to use reagent for quantitatively detecting kinase levels in the samples. It featured high signal to noise ratio, good reproducibility and stability. The signal half-time is over 2 hours. The homogeneous formulation eliminates the procedures of addition of the reagent after cell lysis, as well as decreases experiment errors generated by multiple additions. Moreover, the product is suitable for high throughput sample measurement due to the stable “glow” type luminescence.

Reagent components

Luciferase, luciferin, buffer were mixed and filled in the 10 ml or 100 ml reagent bottles, three packages are showed below:

Cat#	Size	Assays of 96-well plate	Assays of 384-well plate
K4301	10 ml	200 wells	1,000 wells
K4302	100 ml	2,000 wells	10,000 wells
K4303	10X100 ml	20,000 wells	100,000 wells

Procedures

Optimization of kinase reaction

To keep Lumi-Glow™ luminescent kinase assay system in better conditions, we recommend kinase reaction conditions should be optimized, including concentrations of ATP, kinases, and substrates. For 96-well plate, we recommend add 50 µl of Lumi-Glow™ luminescent kinase reagent into 50 µl of kinase reaction system; for 384-well plate, 10 µl of Lumi-Glow™ luminescent kinase reagent into 10 µl of kinase reaction system; for other plates, add 1 volume of Lumi-Glow™ luminescent kinase reagent into 1 volume of kinase reaction system

Optimization of ATP concentration

- Dilute ATP with kinase reaction buffer at 1:2 ratio, add into the plate, add sufficient kinase and kinase substrate. For control wells, add same concentrations of ATP without kinase or kinase substrate. Mix and incubate at room temperature for appropriate time
- Add equal volume of Lumi-Glow™ luminescent kinase assay system, mix
- Read the plate in “luminescence” plate reader after 10 min of reaction

Optimization of kinase substrate concentration

- Dilute kinase substrate with kinase reaction buffer at 1:2 ratio, add into the plate, add sufficient kinase and optimal ATP. Mix and incubate at room temperature for appropriate time
- Add equal volume of Lumi-Glow™ luminescent kinase assay system, mix
- Read the plate in “luminescence” plate reader after 10 min of reaction

Optimization of kinase concentration

- Dilute kinase with kinase reaction buffer at 1:2 ratio, add into the plate, add optimal ATP and kinase substrate. Mix and incubate at room temperature for appropriate time
- Add equal volume of Lumi-Glow™ luminescent kinase assay system, mix
- Read the plate in “luminescence” plate reader after 10 min of reaction

Protocols (for 96-well plate)

- Add ATP, kinase, kinase substrate, kinase reaction buffer into the 96-well plate. Total volume is 50 µl, mix, incubate at room temperature for appropriate time
- Add 50 µl of Lumi-Glow™ luminescent kinase assay system, mix
- Read the plate in “luminescence” plate reader after 10 min of reaction

Storage conditions

Store Lumi-Glow™ luminescent kinase assay kit at -20°C. The product can be stored at 4°C for one week, and can tolerate 10 times of “freeze and thaw”