

HTRF 激酶检测解决方案

激酶简介

激酶是磷酸转移酶的一种，它在控制细胞生长，代谢，分化和凋亡的很多信号通路中起着核心作用。激酶能催化一个磷酸基团从三磷酸腺苷（ATP）转移到特定的底物上。这些底物可以是蛋白、多肽、脂质，糖，核苷，这些底物被磷酸化后会被激活从而发挥出一些特殊功能，例如在信号传导（图 1），调控细胞周期以及代谢等复杂的功能中发挥作用。因此激酶跟人体的多种疾病如肿瘤，炎症，免疫失调，代谢疾病等有关。激酶通常根据它们的底物命名。

激酶当中最大的一类是蛋白激酶，蛋白激酶作用于特定的蛋白或多肽，并改变其活性。目前在人类基因组中已经发现了 500 多种蛋白激酶，占了人类所有基因的 2% 左右。

蛋白激酶可以分为：丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，酪氨酸蛋白激酶，组氨酸蛋白激酶，色氨酸蛋白激酶，天冬酰胺基/谷氨酰胺基蛋白激酶，目前研究的比较多得是前两类。

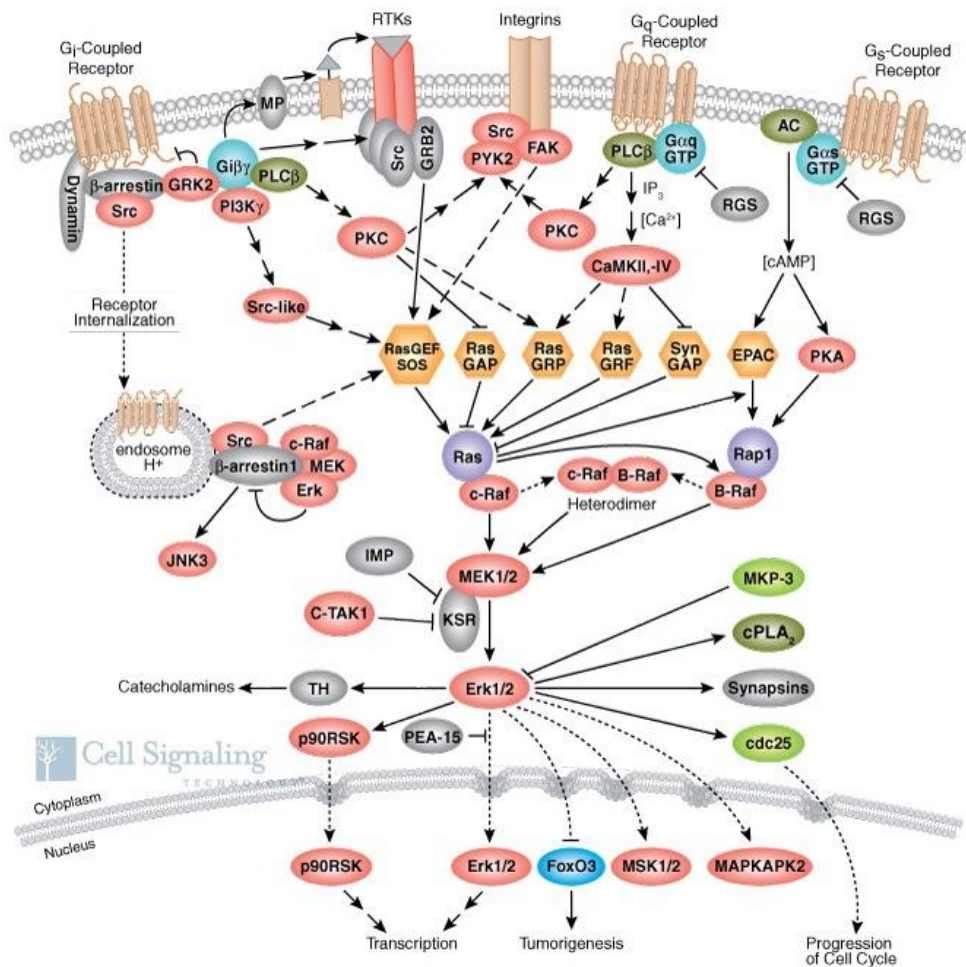


图 1: MAPK/ERK 激酶通路在 GPCR 信号传导中的作用 (本图来自 CST 官方网站)

随着基因泰克（Genetech）的赫赛汀（Herceptin）在 1998 年上市和诺华的格列卫（Gleevec）2001 年上市，以及它们在肿瘤治疗领域取得的成功，蛋白激酶成为继 GPCR 之后最为重要的药物靶标，筛选新的蛋白激酶抑制剂已经成为药筛领域新的热点。

Cisbio 公司利用其专利 HTRF 技术，开发出一系列的激酶平台，可以分为以下四类：**HTRF KinEASE™, HTRF Transcreener ADP, HTRF Kinase toolbox, Cellular Kinase assays**。目前这些技术被世界上几乎所有的大型药企广泛使用，我们将针对这些产品逐一作介绍。

HTRF KinEASE™ 试剂盒

---测定丝氨酸/苏氨酸激酶，酪氨酸激酶活性最方便的平台

丝氨酸/苏氨酸激酶和酪氨酸激酶是药筛的主要靶点。Cisbio Bioassays 和 Millipore 合作研发了基于 HTRF 技术的四个激酶试剂盒，已经有 160 多种激酶利用这个平台上得到了验证。

HTRF KinEASE™ 四个试剂盒的实验方法都是一样的，每一个试剂盒都包含有一个通用的生物素化的多肽底物，一个标记了 Eu 的只针对特异性磷酸化位点的单抗，Sa-XL665 以及实验缓冲液。

如图 2 所示，丝氨酸/苏氨酸激酶试剂盒有三种不同试剂盒，每一种有不同的底物；酪氨酸激酶试剂盒有一种底物，每一种底物都适用于一系列的激酶。同时，为了便于研究者研究不在我们表中的一些丝氨酸/苏氨酸激酶，我们推出了 Discovery 试剂盒，该试剂盒包括了丝氨酸/苏氨酸激酶试剂盒的所有三种底物。



图 2：试剂盒包装

产品特点

- 应用单克隆抗体保证批次的一致性
- 在 100 多种丝氨酸/苏氨酸激酶和 60 多种酪氨酸激酶上验证过
- 酶用量很少
- ATP 浓度没有限制，因此可以用 ATP Km 进行筛选药物
- 每一个底物只有一个位点可以被磷酸化
- 针对酪氨酸激酶有特殊的试剂可以增强底物的稳定性
- 整个实验少于 2 小时
- 反应体系可以减少到 4ul

产品应用

- 丝氨酸/苏氨酸激酶，酪氨酸激酶活性鉴定
- 激酶抑制剂的高通量筛选
- 激酶选择性筛选
- 激酶作用机制研究

实验原理

HTRF KinEASE™ 利用标记了镧系元素 Eu^{3+} 的特异性磷酸化位点的单抗以及 XL665 标记的链霉亲和素跟生物素化的底物形成夹心实验。整个实验包含两步（图 3）：

I. 酶反应步骤

激酶在有或者没有化合物的条件下跟特异的底物混合，加入 ATP 起始反应。

II. 检测步骤

加入用检测缓冲液配置的单抗- Eu^{3+} 和 XL665，在检测缓冲液中含有 EDTA，因此能够终止激酶反应。以上两种检测试剂可以先混合以减少加样步骤。

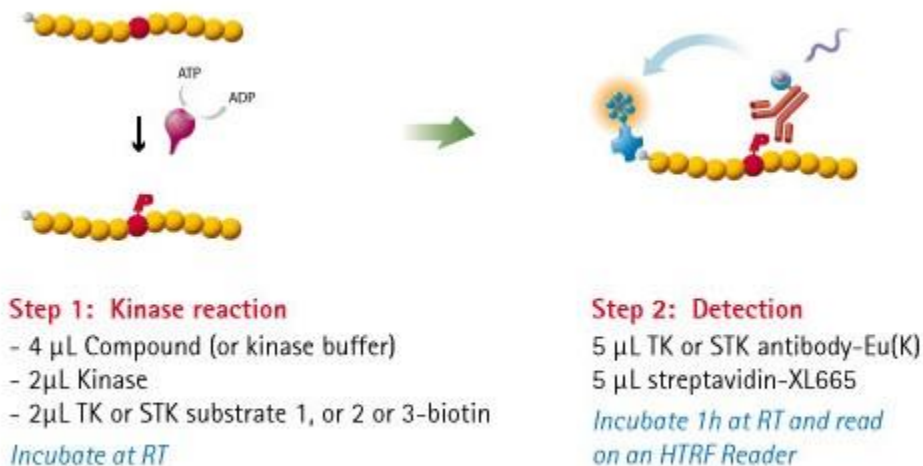


图 3: 实验步骤

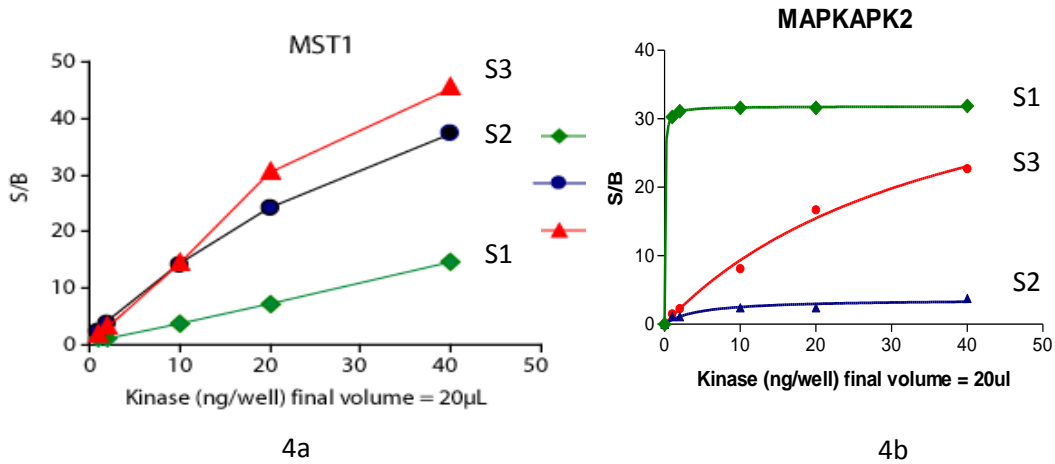
应用实例

1. 利用 Discovery 试剂盒来挑选最适合的底物

Discovery 试剂盒包含了丝氨酸/苏氨酸激酶的三种底物，该试剂盒在实验优化时非常有效。如图 4 所示，STK S3 底物在 MST1 激酶实验中可以产生最大的信号，因此对

MST1 激酶的实验 S3 底物是最好的。而对 MAPKAPK2 激酶而言，STK S1 底物则是最适合的。

反应条件：不同浓度的激酶跟底物 1 uM, ATP 100 uM, 室温 孵育 30 分钟，然后加入 SA-XL665 62.5 nM 以及固定浓度的 STK 抗体，孵育 1 小时后检测。



ABL 5 ng/well, TK sub 1 uM, ATP 100 uM,
SEB range from 0 to 50 nM

TK sub 1 uM, ATP 100 uM, SEB 2.5 nM and
5 nM, ABL range from 0.1 to 10 ng/well.

图 4 :不同浓度的 MST1 和 MAPKAPK2 激酶跟 S1, S2, S3 反应

2. ABL 激酶实验的优化

HTRF KinEASE™ TK 试剂盒带了一个独特的 SEB 缓冲液，能使底物更稳定。同时 SEB 缓冲液能很大程度提高 S-B，从而减少每孔酶的用量。如图 5a 所示，5 ng/孔浓度的 ABL 激酶在不同浓度的 SEB 作用下，S-B 信号差别较大，从图上可以看到 5 nM SEB 可以很大提高 S-B。如图 5b 所示，在 5 nM SEB 条件下，可以减少 ABL 酶的用量至 0.5 ng/孔。

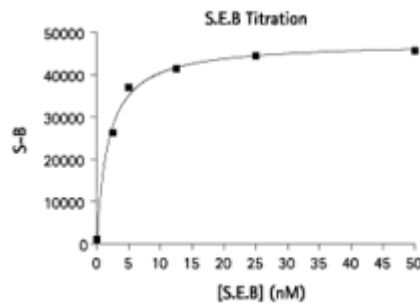


图 5a

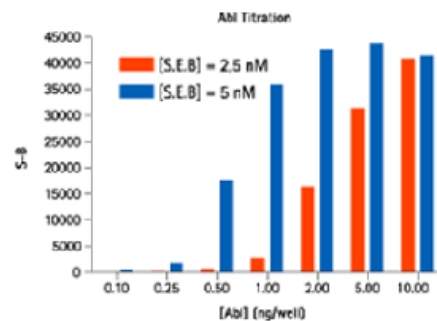


图 5b

图 5 : SEB 在 ABL 激酶实验中的作用

3. Staurosporine 在丝氨酸/苏氨酸激酶实验中的抑制曲线

已有 100 多个丝氨酸/苏氨酸激酶在 HTRF KinEase™ 体系中得到验证。此次实验中选择了 6 个激酶 MAPKAP-K2, CaMKIV, PKC beta II, RSK3, ROCK-II, Pim-1, 优化了酶浓度, 酶反应动力学, 底物和 ATP Km, 以及 SA-XL665 浓度, 然后检测了 staurosporine 的 IC50。从图 6 和表 1 的结果可以看出, HTRF KinEASE™ 的结果跟文献中同位素方法的结果比较一致。

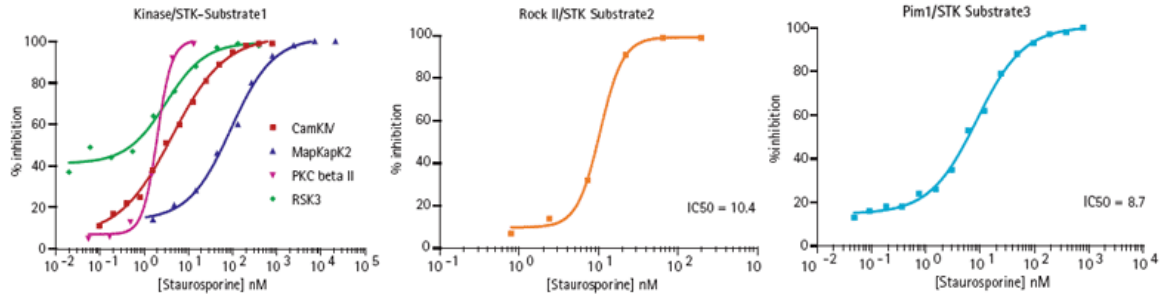


图 6: Staurosporine 的在 6 种激酶实验中的 IC50

	KinEASE™ HTRF* kit			[γ- ³² P] ATP
	Kinase (nM)	STK Substrate (nM)	IC50 (nM)	IC50 (nM)
CamK IV	7.6	95	4.3	x
MAPKAPK2	5.7	8.3	92	54
PKCβ2	5.1	16.4	6	4.8
RSK3	4.6	120	3.1	0.21
RockII	6.5	156	10.4	0.5
Pim1	6.45	161	8.7	5.5

表 1: Starurosporine 的 IC50

经过验证的激酶列表

Serine threonine kinases validated with HTRF KinEASE STK & TK:

HTRF KinEASE STK S1	AMPK	BrSK2	CAMKI	CaMKII α	CaMKII β	CaMKII δ	CaMKII γ	CaMKIV	CHEK1	CHEK2	CHK1
	CHK2	DAPK1	DAPK2	DAPK3	DCAMKL2	DRAK1	LKB1	MAPKAP-K1 α	MAPKAPK1 β	MAPKAP-K2	MAPKAP-K3
	MAPKAPK5	MELK	MLCK	Mnk2	PASK	PHK γ 2	PKC α	PKC β I	PKC β II	PKC δ	PKC ε
	PKC γ	PKC ι	PKC μ	PKC τ	PKC ζ	PKD2	PRAK	PRK2	PRKA	PRKD2	PRKG2
	RPS6KA2	Rsk1	Rsk2	Rsk3	STK22B	STK22D	ZIPK				
HTRF KinEASE STK S2	Aurora A	Aurora B	MARK2	NEK11	PAK2	PAK3	PAK4	PAK5	PAK6	PAR-1B α	PKA
	PKG1 α	PKG1 β	PRKACA	ROCK-I	ROCK-II	ROK α	RPS6KA6	Rsk4	STK6	TBK1	
HTRF KinEASE STK S3	AKT1	AKT2	AKT3	ARK5	ASK1	Aurora C	BrSK1	CDC42 BPA	CDC42 BPB	CLK3	COT
	DMPK	DYRK2	GRK5	GRK6	GSK3 α	GSK3 β	HIPK2	HIPK3	IKK α	IKK β	LOK
	MAP3K8	MARK1	MINK	MINK1	MRCK α	MRCK β	MSK1	MSK2	MSSK1	MST1	MST2
	NEK2	NEK3	NEK6	NEK7	NLK	p70S6K	Pim-1	Pim-2	PKB α	PKB β	PKB γ
	PLK3	RPS6KA4	RPS6KA5	RPS6KB1	SAD1	SGK1	SGK2	SGK3	SGKL	SIK	Snk
	STK23	STK3	STK33	STK4	WNK2	WNK3					
HTRF KinEASE TK	Abl	ABL2	ALK	Arg	Axl	Blk	Bmx	BRK	BTK	c-Kit	CSF1R
	CSK	c-SRC	DDR2	EGFR	EphA2	EphA3	EphA4	EphA5	EphA7	EphA8	EphB1
	EphB2	EphB3	EphB4	ErbB4	FAK	Fer	Fes	FGFR1	FGFR2	FGFR3	FGFR4
	Fgr	Flt1	Flt3	Flt4	Fms	Fps	FRK	Fyn	Hck	IGF-1R	INSRR
	Insulin R	IRR	ITK	JAK2	JAK3	KDR	Kit	LCK	Lyn	Mer	Met
	MST1R	MuSK	NTRK1	NTRK2	PDGFR α	PDGFR β	PYK2	PYK2	PTK5	PTK6	Ret
	Ron	Ros	Rse	Src		TEK	Tie2	TRKA	TRKB	TYRO3	VEGFR1
	VEGFR2	VEGFR3	Yes	ZAP-70							

Please refer to www.htrf.com/kaa for an updated list of kinases already tested with HTRF.

具体每个酶的反应条件请见附录

表 2: HTRF KinEASE™ 平台所验证过的激酶列表

订购信息

试剂盒

产品名称	产品规格	产品货号
HTRF® KinEASE™ STK discovery (STK substrates 1,2 and 3-biotin)	1,000 tests	62ST0PEB
HTRF® KinEASE™ STK S1 (STK substrate1-biotin)	1,000 tests	62ST1PEB
	20,000 tests	62ST1PEC
	100,000 tests	62ST1PEJ
HTRF® KinEASE™ STK S2 (STK substrate2-biotin)	1,000 tests	62ST2PEB
	20,000 tests	62ST2PEC
	100,000 tests	62ST2PEJ

HTRF® KinEASE™ STK S3 (STK substrate3-biotin)	1,000 tests	62ST3PEB
	20,000 tests	62ST3PEC
	100,000 tests	62ST3PEJ
HTRF® KinEASE™ TK (TK substrate-biotin)	1,000 tests	62TK0PEB
	20,000 tests	62TK0PEC
	100,000 tests	62TK0PEJ

补充试剂

产品名称	产品规格	产品货号
STK substrate 1-biotin	50µg/vial	61ST1BLE
	500µg/vial	61ST1BLC
STK substrate 2-biotin	50µg/vial	61ST2BLE
	500µg/vial	61ST2BLC
STK substrate 3-biotin	50µg/vial	61ST3BLE
	500µg/vial	61ST3BLC
TK substrate- biotin	500µg/vial	61TK0BLE
	500µg/vial	61TK0BLC
Sa-XL665	250µg	610SAXLA
	1mg	610SAXLB
	3mg	610SAXLG
Enzymatic Buffer/kinase 5x	50 mL	62EZBFDD
HTRF® Detection buffer	200mL	62SDBRDF
SEB buffer for KinEASE™ assays	20,000 tests (lyoph, to be reconst. with 5 ml H2O)	61SEBALB

HTRF Transcreener® ADP 试剂盒

ADP (二磷酸腺苷)是激酶和 ATP 酶活性实验中最普遍的产物。用 HTRF 方法检测 ADP，能够避免传统 ADP 检测方法的局限性，譬如同位素 ^{33}P 的应用，以及引入额外的酶去检测（如荧光素酶，过氧化物酶，丙酮酸激酶等）。同位素方法特别需要注意实验安全和昂贵的废物处理，而酶相关的检测方法容易带来假阳性并且受到检测灵敏度的影响。跟这些方法不同的是，Cisbio Bioassays 利用其专利 HTRF 技术开发出了非同位素的均相方法，同时检测体系中并没有引入其他酶，从而大大降低假阳性。由于其对底物没有限制，因此实验的选择性也比较大。

ADP Transcreener® ADP 试剂盒利用标记了 Eu^{3+} 的单抗来检测 ADP 的量，跟激酶反应中磷酸化底物的量直接相关。

产品特点

- 应用 ADP 特异性单克隆抗体
- 新的非同位素均相实验
- 检测步骤中没有其它的酶
- 适用于任何底物
- 适用于高浓度 ATP 实验
- 适用于比较困难的激酶实验（脂酶，代谢酶等）
- 可进行 ADP 定量

产品应用

- 激酶和 ATP 酶的实验
- 高通量筛选
- 机制研究

实验原理

Transcreener® ADP 试剂盒是采用竞争性的免疫方法检测反应体系中产生的 ADP。试剂盒中提供了 d2 标记的 ADP，会跟反应中生成的 ADP 竞争试剂盒中所提供的抗 ADP 单抗的抗原结合位点。当反应中生成的 ADP 越多，d2-ADP 跟 mAb-Eu 结合的就越少，从而实验的信号就越小。

如图 7 所示，整个实验分为两步：

- I. **酶反应步骤**：对激酶而言，底物跟激酶孵育，ATP 起始酶反应后，底物被磷酸化同时生成 ADP。对 ATP 酶而言，在反应中 ATP 酶直接催化 ATP 生成 ADP 和无机磷。
- II. **检测步骤**：检测试剂用含有 EDTA 的缓冲液配置后加入酶反应体系中会终止激酶反应。标记了 d2 的 ADP 会跟反应生成的 ADP 竞争结合到 Eu^{3+} 标记的抗 ADP 单抗上。最终得到的 TR-FRET 信号跟反应体系中的 ADP 的量成反比。

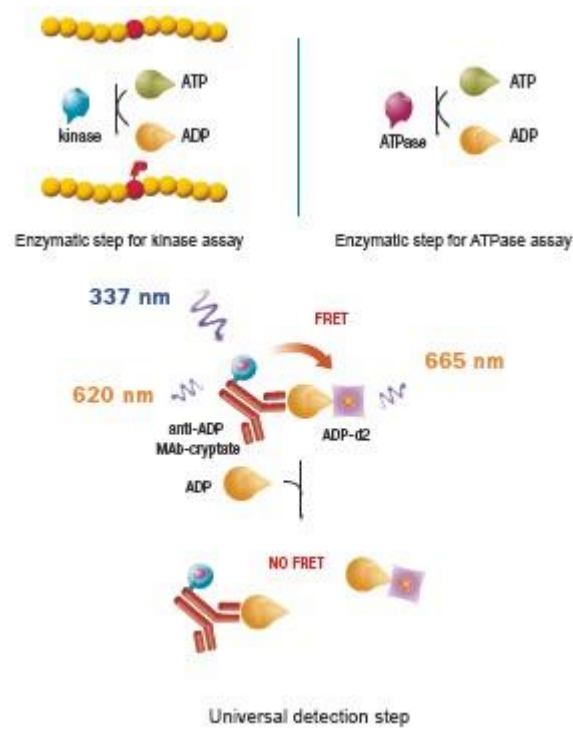


图7：HTRF Transcreeper ADP 实验原理

应用实例

Eg5 是一种 ATP 酶，S-Trityl-L-cysteine 是它的抑制剂，经过优化后，选择的实验条件为 Eg5 60 nM, 在跟不同浓度的 S-Trityl-L-cysteine 混合后（图 8），用 100 uM 的 ATP 起始反应，37 度孵育 90 分钟，然后加入检测试剂，室温孵育 30 分钟后上读板机检测。最终得到的 IC50 值为 0.87 uM 跟文献报道的结果一致。

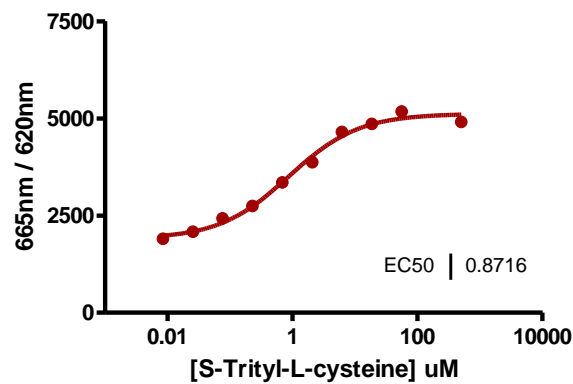


图 8：S-Trityl-L-cysteine 对 EG5 活性的抑制曲线

订购信息

试剂盒

产品名称	产品规格	产品货号
HTRF® Transcreener® ADP	1,000 tests	62ADPPEB
	20,000 tests	62ADPPEC

补充试剂

产品名称	产品规格	产品货号
HTRF® Transcreener® ADP enzymatic buffer 5x	10mL	62ZB1FDC
	50mL	62ZB1FDD
HTRF® Transcreener® ADP detection buffer	13mL	62DB1RDD
	200mL	62DB1RDF

HTRF Kinase 工具箱试剂

Cisbio Bioassays 有一系列的工具箱试剂供客户选择使用，主要有各种标记了 Eu3+ 的抗体，和 d2 或 XL665 标记的抗标签的抗体以及链霉亲和素。

如果您感兴趣的抗体不在我们的列表中，我们还可以提供特殊的标记服务以及实验开发服务。

产品特点

- 大量的已标记的抗磷酸化位点的抗体
- 适用于多种多肽或蛋白底物（带生物素或者标签）
- 对 ATP 浓度没有限制
- 可以使用常规的激酶反应缓冲液
- 反应体系可以减少到 10 uL
- 信号长期稳定
- 可以给客户预留同一批号
- 可以提供抗体标记和开发实验的服务

实验原理

Cisbio Bioassays 有 17 种以上的抗磷酸化丝氨酸/苏氨酸的抗体以及 5 种抗磷酸化酪氨酸的抗体，这些抗体上都标记了荧光能量供体 Eu3+，同时还提供了特异的底物以及与之配合使用的能量受体，可以是 XL665 或者 d2 标记的链霉亲和素，抗 6HIS 抗体，抗 GST 抗体等。这些试剂可以满足实验人员对实验特异性的需求，最终的实验信号跟底物磷酸化的程度成比例。

以一个生物素化的底物组成的实验为例，整个实验分为两部分（图 9）：

I. 酶反应步骤

激酶在有或者没有化合物的条件下跟特异的底物混合，加入 ATP 起始反应。

II. 检测步骤

Eu3+ 标记的抗体跟 XL665/d2 试剂用含有 EDTA 的缓冲液配置后加入酶反应体系中，终止酶反应。这两种试剂可以在用之前混起来加入实验样品中，以减少实验步骤。

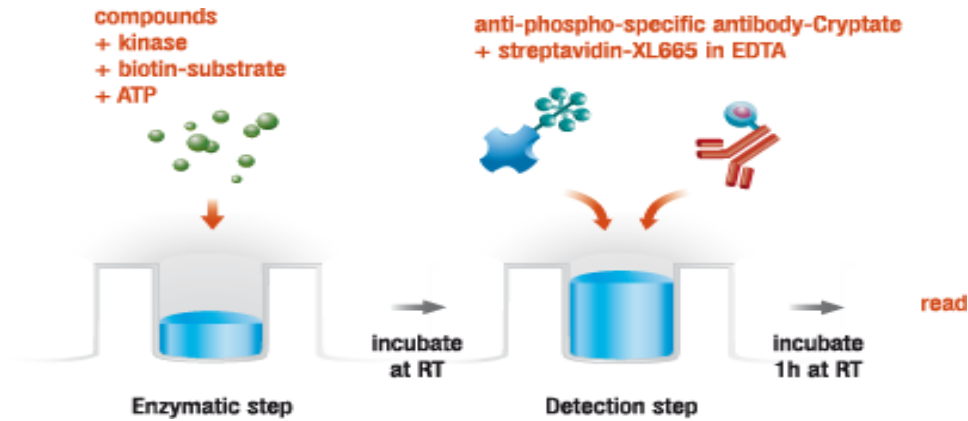
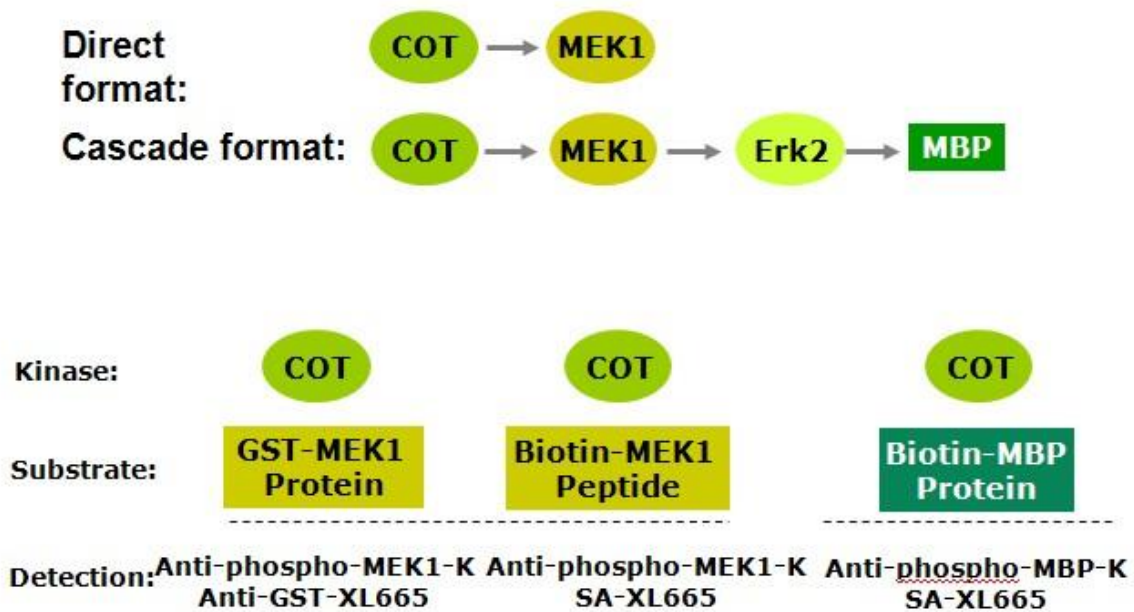


图 9：HTRF Kinase 工具箱试剂作用原理

应用实例

以 COT 酶的活性检测为例，由图 10 的信号通路图可知，该实验可以用直接的反应模式，以其下游的 GST-MEK1 蛋白作底物，利用标记了 Eu3+ 的抗磷酸化 MEK1 的抗体和标记了 XL665 的抗 GST 的抗体组成一个反应体系。同时也可以利用生物素化的 MEK1 多肽作底物，或者进一步利用 MEK1 下游的 ERK2 或 MBP 做底物配合一系列的抗体使用。



From Jia Y et al. Anal Biochem. 2006; 350:268-76

图 10：COT 实验的不同方式

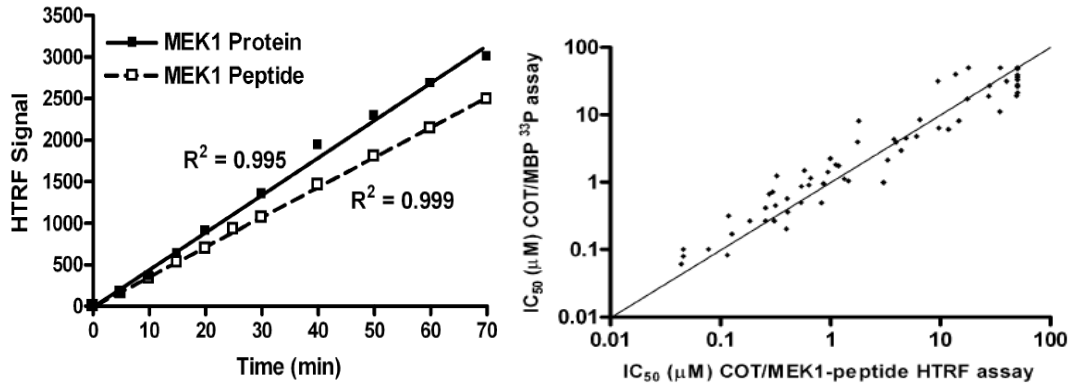


图 11：COT 酶的两实验方法跟同位素实验的比较

从图 11 的结果可以看出不管是用多肽或者蛋白做底物，结果跟传统的同位素都比较一致。

订购信息

丝氨酸/苏氨酸激酶试剂

产品名称	识别的磷酸化底物	产品规格	质量/管 (µg)	产品货号
PAb Anti-phospho-(Ser/Thr) PKA-substrate-KA	CREB (Ser133)	500	0.5	61P01KAE
	(RxxT*xx / RRxS*xx)	10,000	10	61P01KAZ*
		100,000	100	61P01KAY*
PAb Anti-phospho-(Ser/Thr) Akt-substrate-K	PKA (Thr197)	500	1.25	61P02KAE
	(R/KxR/KxxS*/T*)	10,000	25	61P02KAZ*
		100,000	250	61P02KAY*
PAb Anti-phospho-(Ser) PKC-substrate-K	PLK (Ser137)	500	0.75	61P03KAE
	(R/KxS-Hyd-R/K)	10,000	15	61P03KAY*
		100,000	150	61P03KAZ*
MAb Anti-phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) -K	p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	500	1.25	61P04KAE
		10,000	25	61P04KAZ*
		100,000	250	61P04KAY*
MAb Anti-phospho-IkappaB-alpha (Ser32/36)-K	IkappaB-alpha (Ser32)	500	0.25	61P06KAE
		10,000	5	61P06KAZ*
		100,000	50	61P06KAY*
MAb Anti-phospho-	Histone H3 (Ser10)	500	1.25	61P07KAE

Histone H3 (Ser10)-K		10,000	25	61P07KAZ*
		100,000	250	61P07KAY*
MAb Anti-phospho-p53 (Ser15) -K	p53 (Ser15)	500	1.5	61P08KAE
		10,000	30	61P08KAZ*
		100,000	300	61P08KAY*
MAnti-phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)-K	SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	500	0.5	61P09KAE
		10,000	10	61P09KAZ*
		100,000	100	61P09KAY*
MAb Anti-phospho p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)-K	p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	500	1	61P10KAE
		10,000	20	61P10KAZ*
		100,000	200	61P10KAY*
MAb Anti-phospho-Elk-1 (Ser383)-K	Elk-1 (Ser383)	500	2.5	61P11KAE
		10,000	25	61P11KAZ*
		100,000	250	61P12KAY*
PAb Anti-phospho-ATF-2 (Thr71)-K	ATF2 fusion protein [CST#9224]	500	2.5	61P12KAE
		10,000	50	61P12KAZ*
		100,000		61P12KAY*
MAb Anti-phospho-CREB (Ser133)-K	CREB (Ser133)	500	0.25	61P13KAE
		10,000	5	61P13KAZ*
		100,000	50	61P13KAY*
PAb Anti-phospho-c-Jun (Ser73)-K	c-Jun (Ser73)	500	1.25	61P14KAE
		10,000	25	61P14KAZ*
		100,000	250	61P14KAY*
MAb Anti-phospho-Akt (ser473)-K	Akt(Ser473)	500	1.25	61P15KAE
		10,000	25	61P15KAZ*
		100,000	250	61P15KAY*
PAb Anti-phosphothreonine-K	PKA (Thr197)	500	0.25	61PTRKAE
		10,000	5	61PTRKAZ*
		100,000	50	61P15KAY*
PAb Anti-phospho MEK1/2 (Ser 217/221)-K	MEK1/2 (Ser217/221)	500	1.5	61P17KAE
		10,000	30	61P17KAZ*

100,000

300

61P17KAY*

酪氨酸激酶试剂

产品名称	识别的磷酸化底物	产品规格	质量/管(μg)	产品货号
MAb PT66-K	Poly-(GAT) or poly-(GT)- biotin	5,000	7.5	61T66KLA
		20,000	30	61T66KLB
MAb PY20-K	Poly-(GAT) or poly-(GT)- biotin	5,000	10	61Y20KLA
		20,000	40	61Y20KLB

酪氨酸激酶底物

产品名称	产品规格	产品货号	质量/管 (μg)
Poly-(GT)-biotin	5,000	61GT0BLA	250
	100,000	61GT0BLD	5,000
Poly-(GAT)-biotin	5,000	61GATBLA	250
	20,000	61GATBLB	1,000

其他试剂

产品名称	产品规格	产品货号
Enzymatic Buffer/kinase 5x	50mL	62EZBFDD
HTRF Detection buffer	200mL	62SDBRDF
Sa-XL ^{ent}	toolbox reagent	
Sa-XL665		
Anti-6HIS-XL665	toolbox reagent	
Anti-GST-XL665		

基于细胞水平的激酶检测

细胞表面受体（酪氨酸激酶受体，G 蛋白偶联受体，细胞因子受体等）活化后会刺激细胞内各种激酶通路（如图 12）。为了研究这些激酶通路，以及筛选激酶的调节物，Cisbio Bioassays 推出了一系列磷酸化蛋白检测试剂盒。

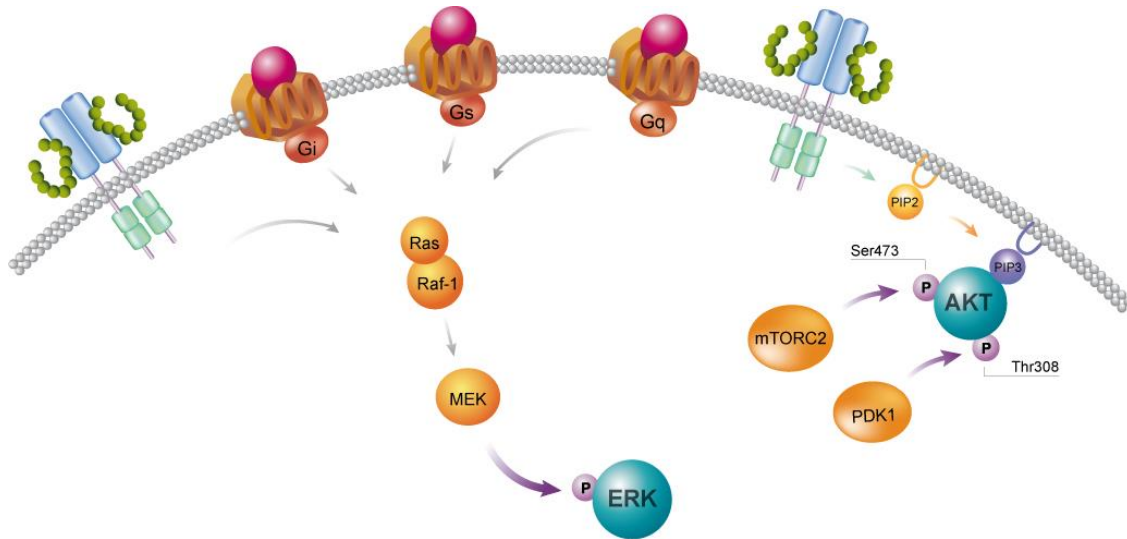


图 12：受体活化后 ERK 和 AKT 信号通路

产品特点

- 简单的实验步骤：可以替代 Western 和 ELISA
- 细胞水平的功能实验
- 基于抗体的检测技术
- 均相直接检测
- HTRF 的稳定性，灵敏性和可靠性
- 适用于研究内源性和过表达的受体
- 适用于包括原代细胞在内的很多细胞
- 比其他技术更好的 Z 值

产品应用

- 细胞内激酶活性的研究
- 信号通路的研究
- 细胞表面受体的研究

实验原理

作为信号通路调节的一部分，受体活化后会促进激酶的磷酸化，细胞膜裂解后，可以用试剂盒中的试剂检测出磷酸化激酶的水平（图 13）。该实验可以用细胞裂解液或者整个细胞来检测，实验的检测是利用两个单抗，一个抗激酶的抗体标记了 d2,另一个抗磷酸化位点的抗体标记了 Eu3+, 这样就组成了夹心的免疫实验。两种抗体可以在加样之前预混，以减少实验步骤。

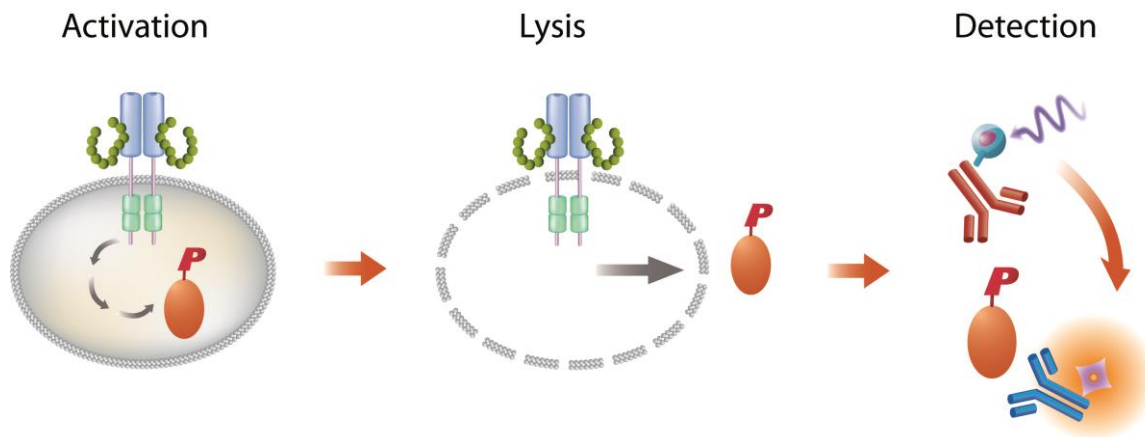


图 13： ERK 和 AKT 实验流程图

所有的实验可以根据使用板子的不同分为两块板实验方案和一块板实验方案。

两块板实验方案

细胞种板，刺激以及裂解都在同一块 96 孔细胞培养板中，裂解后转移样品到检测板中，并加入检测试剂。（图 14）该方案可以观测细胞密度和形态。

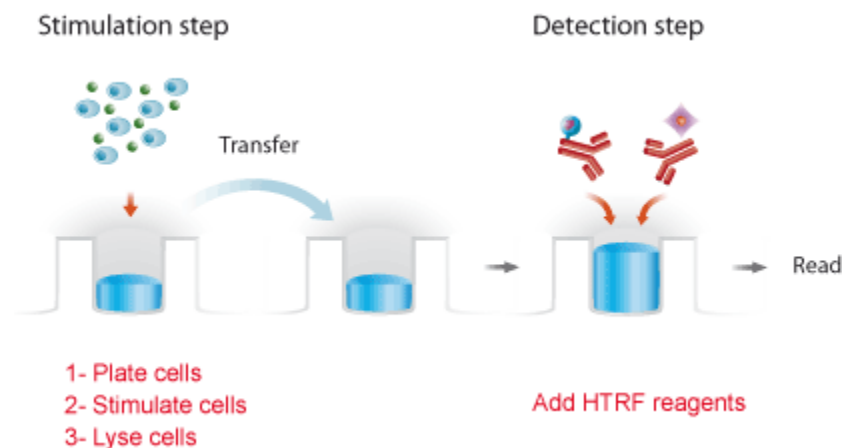


图 14： 需要转板的实验方案

一块板实验方案

细胞种板，刺激，裂解以及检测都在同一块板上进行，不需要任何洗涤的步骤。（图 15）
该方案适合于高通量筛选，在保证 HTRF 数据质量的前提下，可以缩小反应体系。

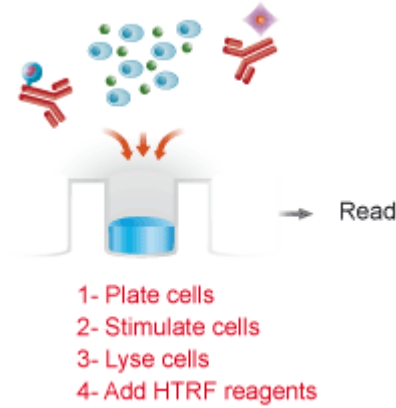


图 15: 不需要转板的实验方案

应用实例

1. IGF 刺激 CHO-M1 细胞后检测磷酸化 AKT (Thr308)

CHO-M1 细胞用 25,000 和 50,000 细胞/孔的浓度种板，饥饿 24 小时后，用不同浓度的 IGF 刺激 10 分钟，然后加入裂解液，转移 16 μ L 裂解液到 384 检测板中，加入两种检测抗体各 2 μ L，室温孵育 3 小时后检测。（图 16 左）

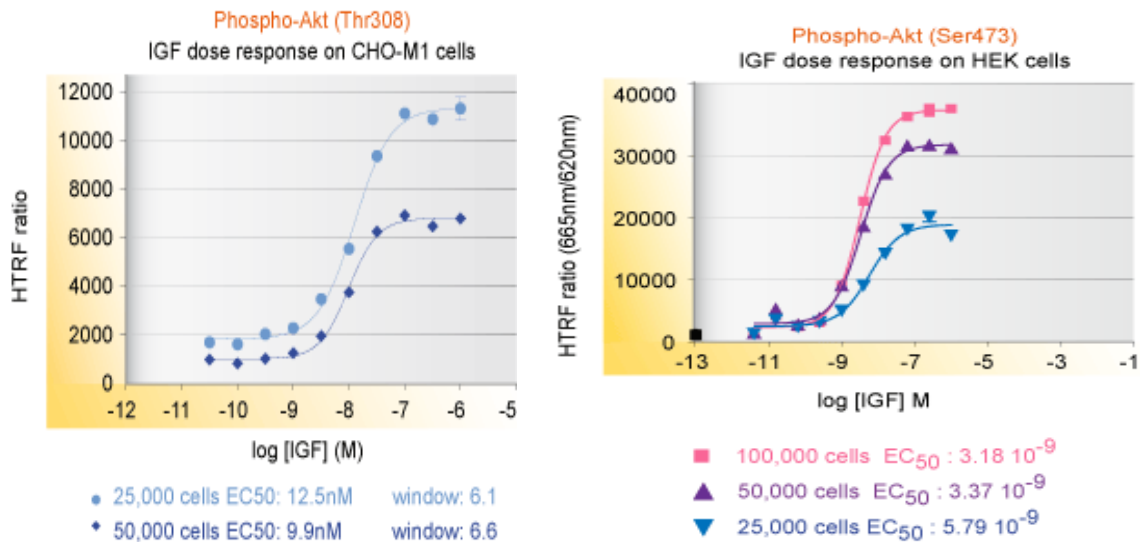


图 16: IGF 对两种不同细胞的刺激

2. IGF 刺激 HEK293 细胞后检测磷酸化 AKT (Thr473)

三种细胞浓度种板后，饥饿培养 24 小时，加入不同浓度的 IGF 刺激 10 分钟，然后按照两块板实验方案操作加入试剂，孵育 3 小时后检测。（图 16 右）

3. Gαq/i 受体活化后 Cellul'erk 的检测

CHO-CCR5 细胞 25,000 细胞/孔种板之后，加入不同浓度梯度的 Rantes 和 MIP-1β 刺激 10 分钟，按照两块板实验方案进行实验。（图 17）

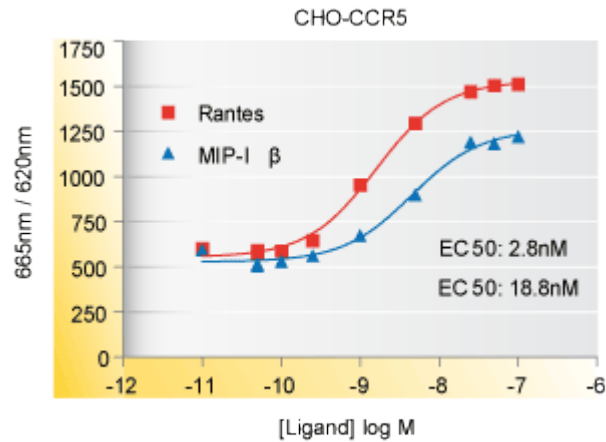


图 17：激动剂刺激下 CHO-CCR5 细胞中磷酸化 ERK 水平的变化

订购信息

试剂盒

产品名称	产品规格	产品货号
Cellul'erk (phospho-Erk1/2)	500 tests	64ERKPEG
	10,000 tests	64ERKPEH
	50,000 tests	64ERKPEI
Phospho-Akt (Ser473)	500 tests	64AKSPEG
	10,000 tests	64AKSPEH
	50,000 tests	64AKSPEI
Phospho-Akt (Thr308)	500 tests	64AKTPEG
	10,000 tests	64AKTPEH
	50,000 tests	64AKTPEI

其他试剂

产品名称	产品规格	产品货号
Cellular kinase blocking reagent	6 mL.	64KB1AAC
Cellular kinase lysis buffer	130 mL	64KL1FDF

附录

HTRF® KinEASE™ 验证过的激酶及其反应条件

激酶反应最通用的条件为: 激酶10 ng/well、ATP 100 μM、底物1 μM、激酶反应缓冲液50 nM加或不加 SEB (Supplement Enzymatic Buffer)、Biotin/Streptavidin 比例为 8/1.

激酶	别名	KinEASE™ 试剂盒	激酶反应缓冲液中应含有的其它成分
Abl		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT, SEB
ABL2	Arg	TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT, SEB
AKT1	PKB alpha	STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
AKT2	PKB beta	STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
AKT3	PKB gamma	STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
ALK		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT, SEB
AMPK	PRKA	STK S1	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 50 μM AMP
Arg	ABL2	TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT, SEB
ARK5		STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
ASK1		STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
Aurora A	STK6	STK S2	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
Aurora B		STK S2	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
Aurora C		STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
Axl		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT, SEB
Blk		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT
Bmx		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT, SEB
BRK	PTK6	TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT, SEB
BrSK1	SAD1	STK S3	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
BrSK2		STK S1	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
BTK		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT, SEB
CAMKI		STK S1	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 500 μM CaCl ₂ , 1 μM Calmodulin
CaMKII alpha		STK S1	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 100 μM CaCl ₂ , 250 μM Calmodulin
CaMKII beta		STK S1	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 500 μM CaCl ₂ , 1 μM Calmodulin
CaMKII delta		STK S1	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 500 μM CaCl ₂ , 1 μM Calmodulin
CaMKII gamma		STK S1	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 500 μM CaCl ₂ , 1 μM Calmodulin
CaMKIV		STK S1	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 100 μM CaCl ₂ , 250 μM Calmodulin
CDC42 BPA	MRCK alpha	STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
CDC42 BPB	MRCK beta	STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT

激酶	别名	KinEASE™ 试剂盒	激酶反应缓冲液中应含有的其它成分
CHEK1	CHK1	STK S1	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
CHEK2	CHK2	STK S1	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
CHK1	CHEK1	STK S1	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
CHK2	CHEK2	STK S1	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
c-Kit	Kit	TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT, SEB
CLK3		STK S3	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT, 30 mM NaCl
COT	MAP3K8	STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
CSF1R	Fms	TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT, SEB
CSK		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT, SEB
c-SRC	Src	TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT
DAPK1		STK S1	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
DAPK2		STK S1	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 500 μM CaCl ₂ , 1 μM Calmodulin
DCAMKL2		STK S1	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 500 μM CaCl ₂ , 1 μM Calmodulin
DDR2		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT, SEB
DMPK		STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
DRAK1		STK S1	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
DYRK2		STK S3	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT, 2 mg/ml Casein
eEF-2K		STK S1	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 500 μM CaCl ₂ , 1μM Calmodulin
EphA2		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT, SEB
EphA3		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT, SEB
EphA4		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT, SEB
EphA5		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT, SEB
EphA7		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT, SEB
EphA8		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT, SEB
EphB1		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT, SEB
EphB2		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT, SEB
EphB3		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT, SEB
EphB4		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT, SEB
ErbB4		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT, SEB
FAK	PTK2	TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT
Fer		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT, SEB
Fes	Fps	TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT, SEB
FGFR1		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT
FGFR2		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT
FGFR3		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT
FGFR4		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT
Fgr		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT, SEB
Flt1	VEGFR1	TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT

激酶	别名	KinEASE™ 试剂盒	激酶反应缓冲液中应含有的其它成分
Flt3		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT
Flt4	VEGFR3	TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT
Fms	CSF1R	TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT, SEB
Fps	Fes	TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT, SEB
FRK	PTK5	TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT, SEB
Fyn		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT
GRK5		STK S3	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT, 2mg/ml Casein
GRK6		STK S3	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT, 2mg/ml Casein
GSK3 alpha		STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
GSK3 beta		STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
Hck		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT
HIPK2		STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
HIPK3		STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
IGF-1R		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT, SEB
IKK alpha		STK S3	2 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
IKK beta		STK S3	2 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
Insulin R		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT, SEB
IRR	INSRR	TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT, SEB
ITK		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT, SEB
JAK2		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT
JAK3		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT
KDR	VEGFR2	TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT, SEB
Kit	c-Kit	TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT, SEB
LCK		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT, SEB
LKB1		STK S1	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
LOK		STK S3	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
Lyn		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT, SEB
MAP3K8	COT	STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
MAPKAP-K1 alpha	Rsk1	STK S1	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
MAPKAPK1 beta	Rsk2	STK S1	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
MAPKAP-K2		STK S1	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
MAPKAP-K3		STK S1	2 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
MAPKAPK5	PRAK	STK S1	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
MARK1		STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
MELK		STK S1	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
Mer		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT
Met		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT
MINK	MINK1	STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
MINK1	MINK	STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT

激酶	别名	KinEASE™ 试剂盒	激酶反应缓冲液中应含有的其它成分
MLCK		STK S1	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 500 μM CaCl ₂ , 1 μM Calmodulin
Mnk2		STK S1	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
MRCK alpha	CDC42 BPA	STK S3	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
MRCK beta	CDC42 BPB	STK S3	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
MSK1	RPS6KA5	STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
MSK2	RPS6KA4	STK S3	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
MSSK1	STK23	STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
MST1	STK4	STK S3	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
MST1R	Ron	TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT , SEB
MST2	STK3	STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
MuSK		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT, SEB
NEK11		STK S2	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
NEK2		STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
NEK3		STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
NEK6		STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
NEK7		STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
NLK		STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
NTRK1	TRKA	TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT
NTRK2	TRKB	TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT, SEB
p70S6K	RPS6KB1	STK S3	2 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
PAK2		STK S2	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
PAK3		STK S2	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
PAK4		STK S2	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
PAK5		STK S2	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
PAK6		STK S2	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
PAR-1B alpha	MARK2	STK S2	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
PASK		STK S1	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
PDGFR alpha		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT, SEB
PDGFR beta		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT, SEB
PHK gamma 2		STK S1	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
Pim-1		STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
Pim-2		STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
PKA	PRKACA	STK S2	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
PKB alpha	AKT1	STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
PKB beta	AKT2	STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
PKB gamma	AKT3	STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
PKC alpha		STK S1	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, lipid activator 1X
PKC beta I		STK S1	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, lipid activator 1X
PKC beta II		STK S1	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, lipid activator 1X

激酶	别名	KinEASE™ 试剂盒	激酶反应缓冲液中应含有的其它成分
PKC delta		STK S1	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, lipid activator 1X
PKC epsilon		STK S1	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
PKC gamma		STK S1	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, lipid activator 1X
PKC iota		STK S1	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, lipid activator 1X
PKC mu		STK S1	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
PKC theta		STK S1	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
PKC zeta		STK S1	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, lipid activator 1X
PKD2	PRKD2	STK S1	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
PKG1 alpha		STK S2	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 10 μM cGMP
PKG1 beta		STK S2	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 10 μM cGMP
PLK3		STK S3	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT, 2mg/ml Casein
PRAK	MAPKAPK5	STK S1	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
PRK2	PRKG2	STK S1	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
PRKA	AMPK	STK S1	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
PRKACA	PKA	STK S2	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
PRKD2	PKD2	STK S1	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
PRKG2	PRK2	STK S1	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
PTK2	FAK	TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT
PTK5	FRK	TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT, SEB
PTK6	BRK	TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT, SEB
PYK2		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT, SEB
Ret		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT
ROCK-I		STK S2	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
ROCK-II	ROK alpha	STK S2	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
ROK alpha	ROCK-II	STK S2	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
Ron	MST1R	TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT , SEB
Ros		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT, SEB
RPS6KA2	Rsk3	STK S1	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
RPS6KA4	MSK2	STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
RPS6KA5	MSK1	STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
RPS6KA6	Rsk4	STK S2	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
RPS6KB1	p70S6K	STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
Rse	TYRO3	TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT, SEB
Rsk1	MAPKAP-K1 alpha	STK S1	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
Rsk2	MAPKAPK1 beta	STK S1	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
Rsk3	RPS6KA2	STK S1	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
Rsk4	RPS6KA6	STK S2	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
SAD1	BrSK1	STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
SGK1		STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT

激酶	别名	KinEASE™ 试剂盒	激酶反应缓冲液中应含有的其它成分
SGK2		STK S3	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
SGK3	SGKL	STK S3	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
SGKL	SGK3	STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
SIK		STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
Snk		STK S3	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
Src	c-SRC	TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT
STK22B	TSSK2	STK S1	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
STK22D	TSSK1	STK S1	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
STK23	MSSK1	STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
STK3	MST2	STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
STK33		STK S3	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
STK4	MST1	STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
STK6	Aurora A	STK S2	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
Syk		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT
TBK1		STK S3	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
TEK	Tie2	TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT, SEB
Tie2	TEK	TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT, SEB
TRKA	NTRK1	TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT
TRKB	NTRK2	TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT, SEB
TSSK1	STK22D	STK S1	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
TSSK2	STK22B	STK S1	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
TYRO3	Rse	TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT, SEB
VEGFR1	Flt1	TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT
VEGFR2	KDR	TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT, SEB
VEGFR3	Flt4	TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT
WNK2		STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
WNK3		STK S3	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
Yes	YES1	TK	5mM MgCl ₂ , 1mM DTT
ZAP-70		TK	5mM MgCl ₂ , 1mM MnCl ₂ , 1mM DTT
ZIPK	DAPK3	STK S1	10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT

建议针对每一个酶都按照试剂盒说明书中的步骤进行优化。

*STK S1: KinEASE™-STK Substrate 1 STK S2: KinEASE™-STK Substrate 2

STK S3: KinEASE™-STK Substrate 3 TK: KinEASE™-TK

更多信息请 浏览www.htrf.com