

产品目录号:

E2510

E2520

E2550

Steady-Glo® 萤光素酶检测简明操作步骤



注意: 这是节选操作步骤, 详细英文说明书见 <http://www.promega.com/tbs/tm051/tm051.html> 本简明操作步骤电子版见 www.promega.com.cn

储存条件: 将冻干粉 Steady-Glo® 底物存于-20°C。底物在 4°C 可以存放至一个月。将 Steady-Glo® 缓冲液存放于低于 25°C 的环境。建议存于 18-22°C 室温, 这样在配制试剂时可以减少温度平衡的时间。试剂配好后要在当天使用, 或在 -20°C 存放最多 2 周。

小心: 冻干粉 Steady-Glo® 底物含有 DTT, DTT 归类为有毒物质。我们建议操作这些试剂时带手套, 穿实验服, 戴安全眼镜。操作或接触这些试剂造成的损伤 Promega 没有责任。

! Steady-Glo® 萤光素酶检测试剂不能与某些化学发光仪 (Luminometer) 配置的自动进样器同用。

III. B. 制备试剂

要制备 Steady-Glo® 试剂, 将 Steady-Glo® 缓冲液倒入装有 Steady-Glo® 底物的瓶中。颠倒混匀, 直到底物完全溶解。

注意:

1. 由于温度决定萤火虫萤光素酶的活性, 所以在定量测定萤光时 Steady-Glo® 试剂温度应恒定。达到这个目的的简单的做法是把试剂平衡到室温 (18-22°C) 来做实验, 室温接近萤光素酶的最佳反应温度 (见第 V. B 部分)。如果缓冲液一直存放在室温的话, 就没有必要在实验前再平衡试剂的温度。
2. 试剂配好后冻于-20°C 的, 在使用前应在低于 25°C 的环境中融解, 以保证试剂性能良好。融解后好好混和。融解并将低温试剂平衡到室温的最简单方便的方法是把它放进室温的水浴锅中。
3. 为了实验结果的重复性最好, 在加入试剂前把培养的细胞平衡到室温 (18-22°C)。
4. 即使不完全混合的影响已被 Steady-Glo® 试剂的配方减到最低, 要想结果的重复性好, 也必须彻底混匀样品 (见 V.A 部分)。

III. C. 检测步骤

1. 将培养有哺乳动物细胞的 96- 或 384- 孔板从恒温箱中取出, 平板必须适于在将要使用的化学发光仪 (Luminometer) 上检测 (如全白板)。
2. 向每孔中加入与孔内培养基体积相等的试剂, 混和。96- 孔板一般将细胞培养在 100uL 培养基中, 加 100uL 试剂。
3. 至少等 5 分钟, 让细胞充分裂解, 然后测量萤光 (查看仪器说明书)。

注意: Promega 研发了 Glo Lysis 缓冲液, 用于 Steady-Glo® 非匀质检测实验中。Glo Lysis 缓冲液的操作步骤在 V. C。

V. C. 用 Glo Lysis 缓冲液的检测步骤:

Glo Lysis 缓冲液 1x, 能够快速裂解 (在 5 分钟之内) 培养的哺乳动物细胞, 而不需要刮下贴壁细胞或进行冻融裂解, 是专利配方。Glo Lysis 缓冲液与 Steady-Glo® 检测试剂相容, 可以检测萤火虫萤光素酶的活性。另外, 建议用 Glo Lysis 缓冲液稀释萤火虫萤光素酶, 因为在室温它能让酶稳定至少 2 天。

Steady-Glo® 萤光素酶检测简明操作步骤



在以下操作步骤中，Glo Lysis 缓冲液与配制好的 Steady-Glo®试剂按 1:1 比例使用。

1. 使用前，将 Glo Lysis 缓冲液平衡到 22°C。
2. 将细胞平衡到室温（18-22°C），吸走培养基，留下细胞。用 1X PBS 洗细胞（可不做）。
3. 加入足够量的 Glo Lysis 缓冲液到样品孔或平板中，覆盖细胞（见表 2）。如果裂解液还要用于其它反应，计算一下其它反应所需的体积。
4. 慢慢晃动平板几次，确保 Glo Lysis 缓冲液完全覆盖细胞。
5. 室温孵育 5 分钟，让细胞裂解。
6. 将裂解液转移到化学发光仪的平板，或管子或小瓶中，再加入与 Glo Lysis 缓冲液等体积的 Steady-Glo®试剂，等 5 分钟，然后按照仪器说明检测荧光。

表 2. 不同平板所需的 Glo Lysis 缓冲液的量

平板	Glo Lysis 缓冲液
100mm	3ml
60mm	1.1ml
35mm	500ul
6 孔	500ul
12 孔	200ul
24 孔	100ul
96 孔	100ul

注意:用 Glo Lysis 缓冲液制备的细胞裂解物可以存放在-20 或-70°C，经过好几个冻融循环仍然稳定。

用 Glo Lysis 缓冲液稀释萤火虫萤光素酶的步骤

如果用 Quantilum® 重组萤光素酶（目录号 E1701）进行**阳性对照**实验，可以将酶在含有 1mg/ml BSA 的 1 x Glo Lysis 缓冲液中稀释到 10⁻⁶。

检测之前，将萤光素酶在室温平衡 20 分钟，或者也可以将 Quantilum® 重组萤光素酶在含有 1mg/ml BSA 的 1 x Glo Lysis 缓冲液中稀释到 10⁻⁵，然后在细胞培养基中按 1:10 稀释（最终稀释度为 10⁻⁶）。

注意:在 Glo Lysis 缓冲液中制成 10⁻³至 10⁻⁶浓度，稀释的酶可以在-80°C 存放最多 3 个月。按每 50ul 一份储存。

进行萤火虫萤光素酶活性检测时，向按上述稀释的 100ul Quantilum®重组萤光素酶溶液中加入 100ul 的 Steady-Glo®检测试剂。等 5 分钟。然后在萤光发光计中读数。