

Steady-Glo[®] 荧光素酶检测试剂盒



在 Veritas[™] 微孔板发光检测仪上的应用

1. 应用说明

Turner BioSystems 公司的 Veritas[™] 微孔板发光检测仪与 Steady-Glo 荧光素酶试剂盒联合使用提供了一种方便、快速且灵敏的定量基因表达的方法。转录调控和荧光素酶报告基因耦联表达，被用在研究培养细胞的生物学领域。荧光素酶是理想的报告基因，因为哺乳动物细胞中不含有内源性荧光素酶，转录完成立刻就生成功能性的荧光素酶。

Steady-Glo[™] 荧光素酶检测系统的荧光素酶检测具有较高的灵敏度，Steady-Glo 试剂的发光半衰期大约为 5 小时，光信号能在加入试剂后 5min 到数小时之间都能检测到。同时 Steady-Glo 试剂应该与哺乳动物细胞培养基（RPMI 1640, MEMa, DMEM and Ham's F12）相匹配，并且不会受到酚红和有机溶剂的影响。

Veritas[™] 微孔板发光检测仪与 Steady-Glo[™] 荧光素酶试剂盒联合使用时，有非常高的灵敏度，最低可以检测到 1×10^{-18} mol 荧光素酶分子。荧光素酶的检测线性范围为 1×10^{-18} - 1×10^{-11} mol 或大于 7 个数量级（图 1）。实验由 Steady-Glo 荧光素酶检测试剂盒（Promega 货号 # E2520）来完成，重组的萤火虫荧光素酶纯化，也用 Promega 产品（Promega 货号 # E1701）。

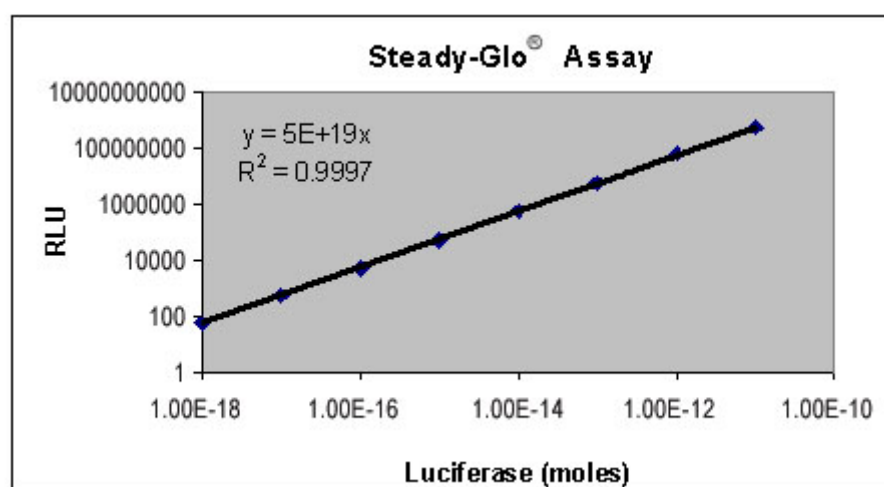


图 1 用 Veritas[™] 微孔板发光检测仪与 Promega 的 Steady-Glo 试剂盒和重组荧光素酶检测所得结果。

2. 所需器材

- [Veritas[™] 微孔板发光检测仪](#)
- 96 孔白板 (E&K Scientific EK-25075)
- Steady-Glo 荧光素酶检测试剂盒 (Promega 货号 E2510, E2520, E2550)
- p200 移液器和匹配枪头

3. 实验方案

3.1 试剂制备

- a) Steady-Glo 底物：使用所提供的底物，-20°C 下可稳定储存6 个月；4°C 下可储存1 个月。
- b) Steady-Glo 缓冲液：使用所提供的缓冲液，储存在25°C 以下的环境条件下。
- c) Steady-Glo 试剂：将整瓶Steady-Glo 缓冲液加入Steady-Glo 底物瓶中，颠倒混匀使底物彻底溶解，使用试验当天配制的试剂，或者将配好试剂储存在-20°C 冰箱中，可储存2 周。

注意：在检测时，Steady-Glo 试剂应当维持在室温，因为荧光素酶的活性对温度比较敏感，配制后冻存的试剂应当在低于25°C 条件下溶解，以确保试剂的性能，并且融化后还应充分混匀。一种最简单的方法就是将试剂在室温水浴下溶解。

3.2 仪器安装

- a) 双击Veritas 图标运行软件。
- b) 从"Welcome to Veritas"对话框中点击"Run Promega Protocol"。
- c) 从Promega 预设程序中选择" SteadyGlo "。
- d) 在"Main Dialog Box"中点击"Options"，选择需要检测的孔，修改检测次数；同时也可以在其他"Other Options"中修改检测时间，修改结束点击"Apply Changes"，返回"Main Dialog Box"窗口。
- e) 在"Main Dialog Box".中输入个人信息，例如"Experiment", "Operator", "Plate No.", and "Notes"

3.3 样品分析

- a) 从培养箱中取出含有培养基的96 孔板。
注意：为了尽可能获得数据重现性。加入试剂前，应室温下平衡细胞培养基。
- b) 加入与孔中培养基或者细胞裂解液等量的Steady-Glo™ @工作液混合后检测萤火虫荧光素酶活性，对于96 孔板，100ul 的细胞培养基中加入100ul 检测试剂。
- c) 等待5分钟使细胞充分裂解，开始检测。
- d) 将板放入Veritas™微孔板发光检测仪中，点击“Start”开始检测，检测结束后，所
- e) 有需要检测的样品检测结果会以Excel 表格形式显示，如检测中遇到其他问题，请参考问题导读获取更多信息
- f) 检测结束就可以通过Excel 进行数据分析。
- g) 检测结束后，确保从仪器中取出96 孔板。

4. 关于 Veritas™ 微孔板发光检测仪

Veritas™ 微孔板发光检测仪是 Turner Biosystems 公司生产的一款专门用于生物发光与化学发光检测的微孔板型发光检测仪。Veritas™ 微孔板发光检测仪具有极高的检测灵敏度 (3×10^{-21} moles 荧光素酶) 和极宽的检测范围 (>9 数量级)，可以满足各种发光检测的需求。