

Steady-Glo 荧光素酶检测试剂盒

在 GloMax[®]20/20 发光检测仪上的应用



1、应用介绍

GloMax[®]20/20 发光检测仪与 Steady-Glo[®]检测试剂盒连用为基因表达的定量检测提供了一种便捷、快速、灵敏的方法。利用转录调控和荧光素酶报告基因耦联表达,常被用于研究培养细胞的多种生物学特性。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荧光素酶,且一旦转录完成立即生成功能性的荧光素酶。

Steady-Glo[®]荧光素酶检测系统是专为最大限度的提高检测试剂的灵敏度而设计,该系统提供一种半衰期约为 5 小时的荧光信号。信号可在加入检测试剂后 5 分钟到几个小时之内进行检测。该试剂被广泛应用于制药和生物技术行业。而且它与哺乳动物细胞培养中常用的培养基如 RPMI 1640, MEM, DMEM, and Ham's F12 等兼容,对酚红和有机溶剂具有耐受性。

高度灵敏的 GloMax[®]20/20 发光检测仪与高效的 Steady-Glo[®]的试剂连用可检测到极低水平的荧光素酶活性。GloMax[®]20/20 发光检测仪最低可以检测到 1×10^{-19} mol 荧光素酶分子。检测线性范围从 1×10^{-19} to 1×10^{-11} mole 荧光素酶,线性范围为 8 个数量级(图 1)。所有检测均使用 Steady-Glo[®]荧光素酶检测试剂盒 (Promega 货号 E2520) 和纯化的重组萤火虫荧光素酶 (Promega 货号 E1701)

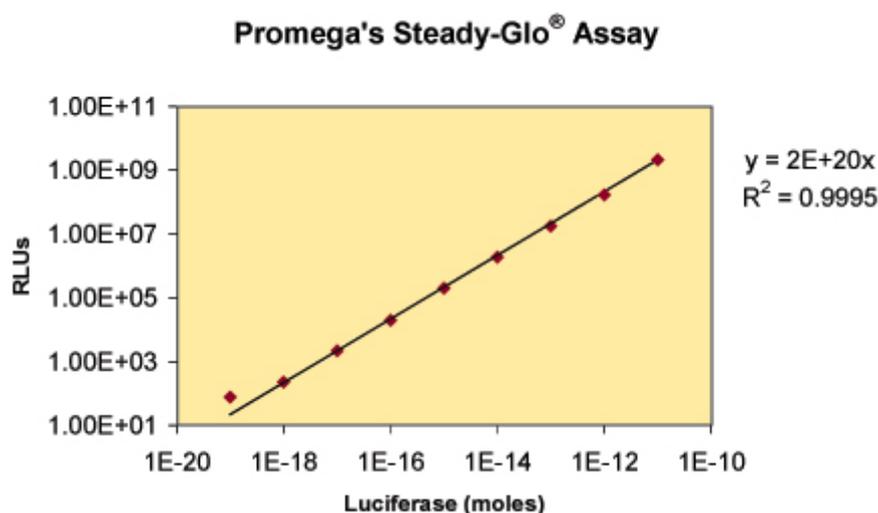


Figure 1. Steady-Glo[®] Assay was performed on the Glomax 20/20 Luminometer using Promega's Steady-Glo[®] Reagent kit and recombinant luciferase.

2、实验材料

- [GloMax[®]20/20 发光检测仪](#)
- 1.5 mL 离心管
- Steady-Glo[®] 荧光素酶检测试剂盒 (Promega 货号 E2510, E2520, E2550)
- p200 移液器和枪头

3、实验方案

3.1 试剂制备

Steady-Glo[®]底物：使用所提供产品，-20℃储存，6 个月。底物也可以储存在4℃ 1 个月。

Steady-Glo[®]缓冲液：使用所提供产品，低于25℃储存。

Steady-Glo[®]试剂：将一瓶Steady-Glo[®]缓冲液倒入1瓶Steady-Glo[®]底物中配置Steady-Glo[®]反应试剂，颠倒混匀，直到底物彻底溶解。配好试剂最好当天使用，也可以再-20℃储存2周。

注：因为荧光素酶活性受温度影响，在定量发光检测过程中，Steady-Glo[®]试剂应始终保持室温。冻存的试剂再次使用时，为确保试剂性能，应在低于25℃条件下溶解。溶解后充分混匀，最简单的方法是在室温水浴下溶解。

3.2 仪器准备

3.2.1 开机，预热5分钟（非必须）

3.2.2 点击"Protocols"菜单中"Run Promega Protocol" 图标

3.2.3 从Promega 预设程序中选择"Steady-Glo"。屏幕上出现的参数即可用于Steady Glo检测。

3.2.4 点击"Advanced Options"图标，进入"Replicates"和"Automatic Blank Subtraction"功能（可选）

3.2.5 点击"OK"返回"Home"界面。

3.3 样品分析

3.3.1 从培养箱中取出培养细胞

注：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。

3.3.2 加入与培养基等量的Steady-Glo[®]工作液。

3.3.3 等待五分钟使细胞充分裂解。然后将样品转移至 1.5 mL 离心管中进行分析。

3.3.4 将离心管插入 GloMax[®]20/20 发光检测仪（使用离心管检测室），点击"Measure Luminescence"开始检测。

4. 关于 GloMax[®]20/20 发光检测仪

GloMax[®]20/20 发光检测仪是一款专门用于生物发光与化学发光检测的单管型发光检测仪。GloMax[®]20/20 发光检测仪具有极高的检测灵敏度（ 1×10^{-21} moles 荧光素酶）和极宽的检测范围（>8 数量级），可以满足各种发光检测的需求。

5. 参考文献

1. Ow, D.W. et al. (1986) Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* 234, 856-9.
2. De Wet, J.R. et al. (1987) Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells, *Mol. Cell. Biol.* 7, 725-37.