

Luciferase Assay System

简明操作指导

注意：这是节选操作步骤，详细英文说明书见
www.promega.com/protocols/

适用产品目录号：E1483,E1500,E1501,E1531,
E4030,E4530,E4550

I. 需用户自备的材料

- 不透光多孔白板或发光检测管
- 发光检测仪或带发光模块的多功能微孔板读数仪

II. 试剂准备和储存条件

1. **制备萤光素酶检测试剂 (LAR)**：将 Luciferase Assay Buffer (目录号 E4550 中的是 105ml, 其他目录号中的是 10ml) 加到含有冻干底物 Luciferase Assay Substrate 的瓶中, 混合, 使底物溶解。为避免反复冻融, 请将配好的萤光素酶检测试剂 (LAR) 分装成单次使用的小份儿, 并将未使用的 LAR 储存于 -20°C (可保存 1 个月) 或 -70°C (可保存 1 年)。每次使用前需将 LAR 平衡至室温 ($22-25^{\circ}\text{C}$)。(不要在高于 25°C 融化 LAR)

注意：必须将整瓶 Luciferase Assay Buffer 倒进 Luciferase Assay Substrate 瓶中, 不可将冻干底物取出称量配制。

2. **配制 1X 裂解试剂**：将 4 倍体积的水加到 1 倍体积的 5X 裂解试剂中 (Cell Culture Lysis Reagent [CCLR], 目录号 E1531; Reporter Lysis Buffer [RLB], 目录号 E3971), 混合均匀。使用前需平衡至室温。

将 Cell Culture Lysis Reagent 储存于 -20°C 。Reporter Lysis Buffer 可在室温 ($22-25^{\circ}\text{C}$) 保存, 远离阳光直射处。

III. 操作步骤

1. 哺乳动物细胞裂解液的制备和检测

- 1) 去除培养细胞中的培养基。
- 2) 用 1X PBS 清洗培养细胞, 注意不要使细胞脱落。尽量将清洗液去除干净。
- 3) 将足够覆盖细胞的 1X 裂解试剂 (CCLR、RLB 或 PLB) 加到细胞中 (例如, $400\mu\text{l}/60\text{mm}$ 培养皿, $900\mu\text{l}/100\text{mm}$ 培养皿或 96 孔板 $20\mu\text{l}/\text{孔}$)。如果使用 RLB, 要做一次冻融循环以保证完全裂解。
- 4) 将培养皿中的贴壁细胞刮下来, 然后把细胞和所有液体转移到一个离心管中。短暂离心 (室温 $12,000 \times g$ 离心 15 秒或 4°C 最多离心 2 分钟) 以沉淀碎片, 然后将上清液转移到一个新管中。
- 5) 将 $20\mu\text{l}$ 细胞裂解液与 $100\mu\text{l}$ 萤光素酶检测试剂 (LAR) 混合均匀, 检测发光信号。

2. 植物组织裂解液的制备和检测

- 1) 在液氮中快速冷冻植物组织, 将冷冻组织研磨成粉末, 用室温的 1X CCLR 重新悬浮并匀浆。
- 2) 短暂离心以沉淀碎片, 然后将上清液转移到一个新管中。

3) 将 20 μ l 细胞裂解液与 100 μ l 萤光素酶检测试剂 (LAR) 混合均匀, 检测发光信号。

3. 细菌细胞裂解液的制备和检测

- 1) 将 40 μ l 未转化细胞 (“carrier cells”) 与 50 μ l 转化的培养物混合。
- 2) 加入 10 μ l 1M K_2HPO_4 (PH 7.8), 20mM EDTA。
- 3) 在干冰上快速冷冻混合物, 然后将管子置于室温水浴中以使细胞平衡到室温。
- 4) 加入 300 μ l 新鲜配制的裂解混合物 (lysis mix) *, 混匀并于室温孵育 10 分钟。
- 5) 将 20 μ l 细胞裂解液与 100 μ l 萤光素酶检测试剂 (LAR) 混合均匀, 检测发光信号。

* 裂解混合物 (lysis mix) :

1X CCLR

1.25mg/ml lysozyme

2.5mg/ml BSA

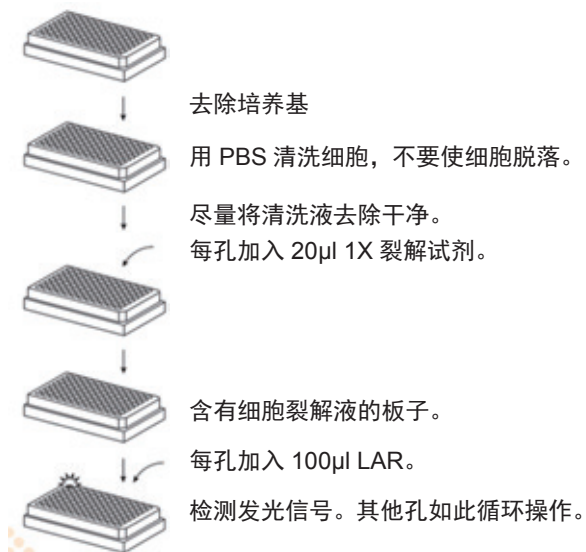
以配制 10ml 裂解混合物为例: 在试管中加入 2ml 的 5X CCLR, 2.5ml 新鲜配制的 lysozyme (5mg/ml) #, 25mg BSA, 加水定容至 10ml。每次使用前新鲜配制。

#lysozyme (5mg/ml) : 将 1 倍体积的 1M K_2HPO_4 (pH 7.8), 20mM EDTA 加到 9 倍体积的水中, 再加入适量的溶菌酶 (lysozyme) 使其终浓度为 5mg/ml。涡旋振荡使溶菌酶溶解。每次使用前新鲜配制。

简易流程图

检测 96 孔板中的样品

注意: 1. 96 孔板操作时发光检测仪 (Luminometer) 需配有自动进样器。2. 测量时, 使用 1-2 秒延迟和 5-10 秒整合 (读数)。



检测培养皿中的样品

