

EZ-One Glow Luciferase Assay Kit

说明书

Cat. No.: EZB-OG1

一、产品简介

EZ-One Glow Luciferase Assay Kit是一款萤火虫荧光素酶报告基因检测试剂盒，具有灵敏度高、发光信号稳定的特点，可以对荧光素酶在哺乳动物细胞中的表达进行高通量检测。萤火虫荧光素酶（Firefly luciferase）在氧气、ATP和镁离子存在的条件下，能够催化荧光素（luciferin）氧化成oxyluciferin，并在反应过程中会发出波长为560 nm左右的生物荧光，该荧光可通过化学发光仪进行测定。检测原理如图1所示。

本试剂盒可用于多种常用细胞培养液：RPMI 1640、DMEM、MEMα、Ham's F12、AmnioMax、CD CHO、CD 293等，其半衰期均为60 min以上（22℃），满足绝大多数高通量实验需求。本试剂盒为单瓶装的预混型试剂，将试剂充分融化后恢复到室温（22℃）即可使用，操作非常简便。同时本试剂具有高度的稳定性，能够在4℃稳定保存1周以上，同时活性不低于在-20℃保存的85%。

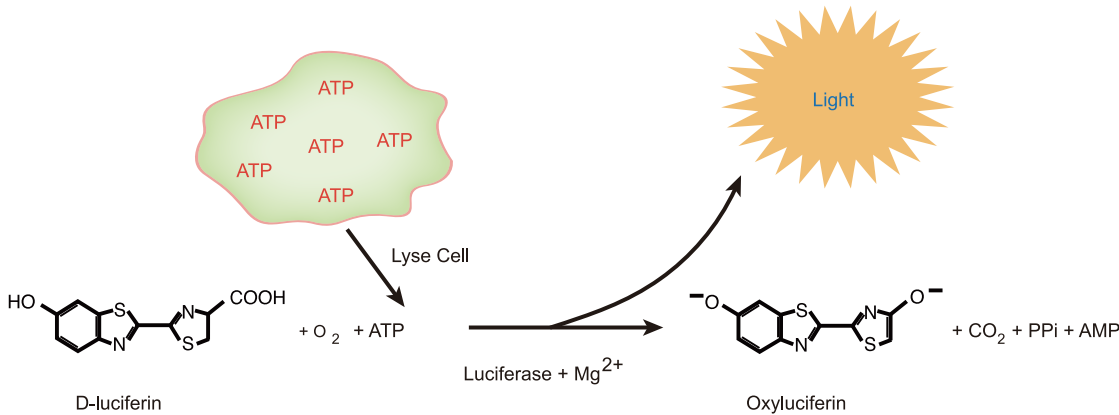


图1. EZ-One Glow Luciferase Assay Kit试剂盒原理概述

二、产品组分

货号（规格）	EZB-OG1-S	EZB-OG1	EZB-OG1-L
组分			
EZ-One Glow Luciferase Assay Reagent	10 ml	100 ml	100 ml × 5

注：对于 EZB-OG1-S：足以在 96 孔板中进行 100 次 assays，每次 assay 用 100 μl；或 384 孔板中进行 400 次 assays，每次 assay 用 25 μl。

三、保存条件

未拆封的试剂盒于-80℃避光可保存 12 个月，于-20℃避光可保存 2 个月。过期日期详见产品标签中有效期信息。分装后的 EZ-One Glow Luciferase Assay Reagent 可于-80℃避光保存 1 年，或-20℃短期保存不超过 2 个月。为了获得最大的光信号，我们建议收到该试剂后，充分融化并混匀后，分装冻存于-80℃。该试剂可稳定进行 10 次冻融循环，活性损失小于 10%。

四、自备材料

具有发光检测（Luminescence）模块的酶标仪、适合于发光检测的标准不透明壁多孔板（贴壁处理的无菌板）、多孔板振板装置、单通道或者多通道移液器、水浴锅。

五、操作步骤

1. 试剂准备

1.1 首次使用时先将 EZ-One Glow Luciferase Assay Reagent 充分融化，充分混匀后根据使用需求进行分装并做好标记，建议 -80°C 长期保存或 -20°C 保存不超过 2 个月。

1.2 将分装冻存后的 EZ-One Glow Luciferase Assay Reagent 放在 4°C 冰箱中过夜解冻，或在 22°C 水浴锅中解冻，注意水温不要超过 25°C。

注意：如果 EZ-One Glow Luciferase Assay Reagent 在 -80°C 下保存，请勿将其直接转移到 22°C 水浴中解冻。请先将试剂在工作台上放置 10 ~ 15 min，然后将其放入 22°C 水浴中，放置约 45 ~ 60 min，使试剂温度达到约 22°C。

1.3 若本试剂是在非室温条件下解冻的，使用前需要将其置于 22°C 水浴锅中 15 ~ 30 min 以平衡至 22°C。

注意：在 22°C 的水浴中，一般 100 ml、4°C 解冻的本试剂需要约 30 min，以平衡至 22°C。

1.4 使用前将平衡至 22°C 的试剂上下颠倒 10 次使之充分混匀。

2. 发光检测步骤

2.1 从培养箱中取出细胞培养板，室温（约 22°C）放置约 30 min 使培养板的温度平衡至室温。

2.2 加入与待测细胞培养液等体积且平衡至室温的 EZ-One Glow Luciferase Assay Reagent（例如，使用 96 孔培养板时，将 100 μ l EZ-One Glow Luciferase Assay Reagent 添加到 100 μ l 的待测细胞培养液中）。

2.3 室温振荡混匀 3 ~ 10 min，使细胞充分裂解。

2.4 使用多功能酶标仪进行化学发光检测。根据仪器要求设置相应的参数，每孔的检测时间一般为 0.25 ~ 1 sec，具体需根据仪器的检测灵敏度进行适当的调整。

六、注意事项

1. 温度：发光信号的强度和衰减速率取决于荧光素酶反应速率。温度是影响该酶测定速率并因此影响荧光输出的一个因素。因此为了保持检测结果的一致性，在加样前需要将本试剂与细胞培养物均平衡至室温（约 22°C）。注意批量操作时，从 37°C 恒温箱中取出的并在室温下堆叠放置的多孔板比单层放置的多孔板需要更长的时间平衡至室温，未充分平衡可能会使多孔板中心和边缘孔间出现温度梯度效应。
2. 化学物质：不同培养基的化学成分会有差异，这样会影响荧光素酶反应的酶促速率，进而使发光强度和衰减速率会有不同。药物含量较高时可能会干扰荧光素酶反应，从而影响化学发光信号。建议设置含有溶剂的细胞培养液对照孔以排除溶剂的干扰。
3. 多孔板：建议使用适合于发光检测的标准不透明壁多孔板，不同类型的多孔板测得的发光强度也会有所不同。如在不透光的白色孔板中培养细胞，可直接在发光检测仪上检测读数；如在透明孔板中培养细胞，需加入试剂待细胞充分裂解后，将所有样品转移至不透光的白色孔板中进行检测。
4. 混匀：只有当 EZ-One Glow Luciferase Assay Reagent 与培养的细胞完全混匀后使细胞充分裂解时才能获得最佳的检测结果。悬浮细胞相对于贴壁细胞更容易混合均匀，加样后可省略混匀步骤，对检测结果无显著影响。若待测样品为贴壁细胞，可通过延长振板时间或加大振板频率等操作提高混匀与裂解效率。384 孔板相较于 96 孔板更不易混匀，混匀时可能需要使用半径小于孔直径的特殊电磁振动设备。建议通过显微观察确定细胞的裂解程度，以优化混匀方案。

七、代表性实验结果

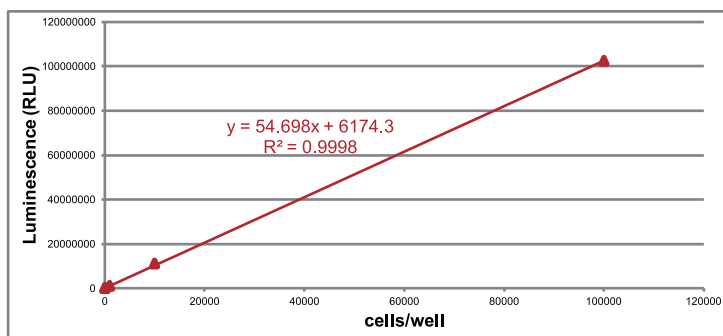


图 2. 细胞数目与发光的线性关系。使用培养基连续梯度稀释细胞，制备不同密度的细胞悬液。每种密度的细胞悬液取 100 μ l 加入 96 孔酶标板中，分别加入 EZ-One Glow Luciferase Assay Reagent (100 μ l)，振荡裂解 3 min 后，检测发光。结果表明，本试剂在宽广的范围内具有良好的线性关系。

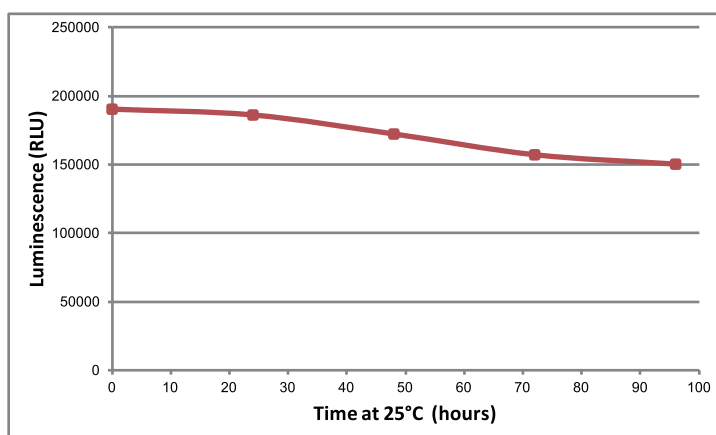


图 3. 试剂在 25°C 放置不同时间的稳定性检测。向 10000 个细胞(含 100 μ l 培养基)中加入放置不同时间长度的 EZ-One Glow Luciferase Assay Reagent (100 μ l)，振荡裂解 3 min 后，检测发光。结果表明，本试剂在 25°C 的保存条件下仍具有较高的稳定性。

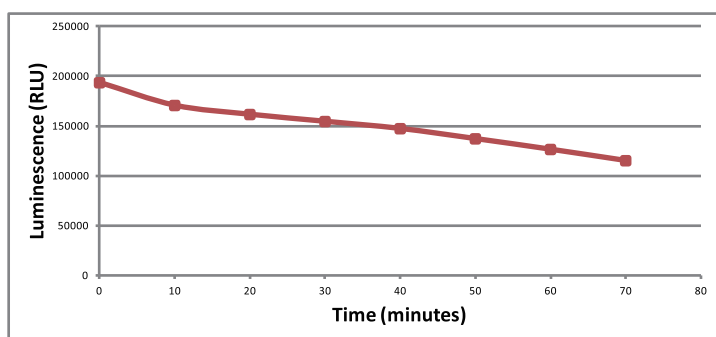


图 4. 荧光信号稳定性检测。向 10000 个细胞(含 100 μ l 培养基)中加入 EZ-One Glow Luciferase Assay Reagent (100 μ l)，振荡裂解 3 min 后，静置 0、10、20、30、40、50、60、70 min 后分别检测发光。结果表明，本试剂荧光信号稳定，满足足绝大多数的实验需求。