Promega

Quick PROTOCOL

Nano-Glo® Live Cell 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/

产品 N2011，N2012 和 N2013 简要操作说明

Nano-Glo®Live Cell Reagent 是一种非细胞裂解性的检测试剂，可用于监测活细胞中来自 NanoLuc® 萤光素酶或 NanoBiT® 检测系统的生物发光。检测试剂中包含可渗透细胞的 Furimazine 底物，以及用于减少自发光和降低检测背景的专有试剂。
若需要进行 NanoBiT® 检测，请参阅 NanoBiT® protein：Protein Interaction System 技术手册 #TM461 以了解详细实验方案。

Nano-Glo® Live Cell Reagent 的制备

1. 首次使用时，请将 Nano-Glo® LCS Dilution Buffer 平衡至室温。
2. 取出 Nano-Glo® Live Cell Substrate, 并将其混匀。
3. 如果管盖或管壁上含有 Nano-Glo® Live Cell Substrate，请在微型离心机中将装有底物的管子瞬时离心。
4. 将 1 倍体积的 Nano-Glo® Live Cell Substrate 与 19 倍体积的 Nano-Glo® LCS Dilution Buffer（稀释 20 倍）混合，制备出实验所需量的 Nano-Glo®Live Cell Reagent。例如，如果实验需要 20ml 试剂，则将 1ml 底物与 19ml 稀释缓冲液混合即可。

注意：

1. Nano-Glo®Live Cell Substrate 需储存于 -20℃。首次使用时，请将 Nano-Glo® LCS Dilution Buffer 解冻，并于室温保存。
2. 每次实验所使用的 Nano-Glo®Live Cell Reagent 应现配现用。我们不建议在任何温度下长期保存此溶液。
3. 配制好的 Nano-Glo®Live Cell Reagent，在 20℃下 3 小时左右会失去 10% 的活性。而在 4℃下，该试剂在 7 小时左右会失去 10% 的活性。

在 96 孔板中检测发光

1. 将 Nano-Glo®Live Cell Reagent 平衡至室温。
2. 从培养细胞的 96 孔板中吸出培养基，替换为 100µl 缓冲的细胞培养基，例如 Opti-MEM® I 减血清培养基（Life Technologies Cat.#11058），含有 0–10%（v/v）胎牛血清（FBS）。

注意：我们建议使用缓冲的细胞培养基（例如含有 HEPES 的培养基），以便在 CO_2 培养箱外检测发光时可以维持细胞的生理 pH 值。

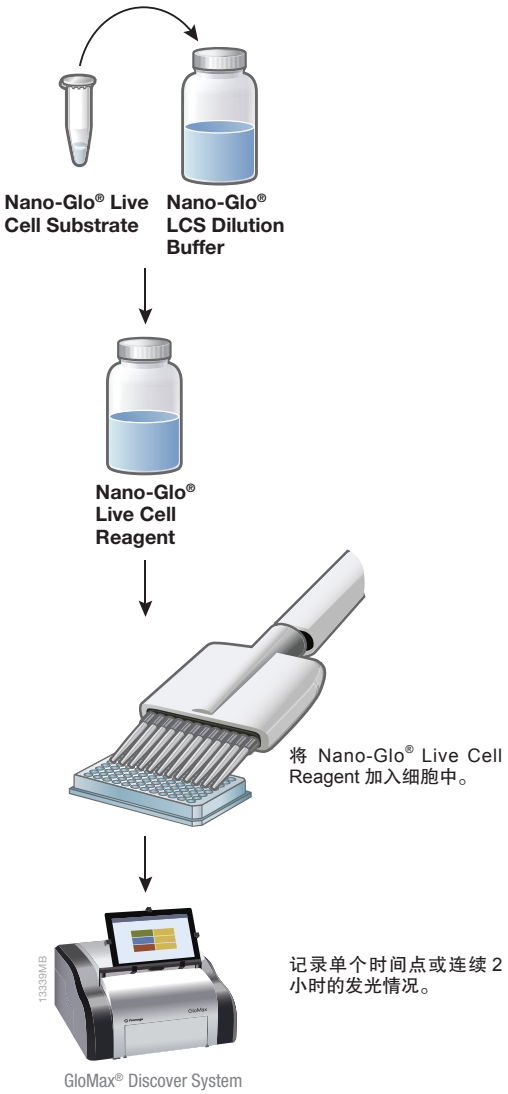


图 1.Nano-Glo®Live Cell Reagent 制备和使用流程图

3 在每个孔中加入 25µl Nano-Glo® Live Cell Reagent，手动或用定轨振荡器（如，在 300-500rpm 下振动 15 秒）轻轻将其混合。

注意：细胞需保持完整活力。

4. 在单个时间点加入 Nano-Glo® Live Cell Reagent 后，立即进行发光检测。或者在 2 个小时内的多个时间点连续进行发光检测。将整合（integration）时间设置为 0.25-2 秒。

注意：信号强度和稳定性会随实验条件不同而发生变化。在发光水平高时，由于酶周转增加以及 Furimazine 底物的损失，信号衰减的速率会增加。在发光水平较低时，信号衰减的速率则主要由 Furimazine 不稳定性决定（图 2）。

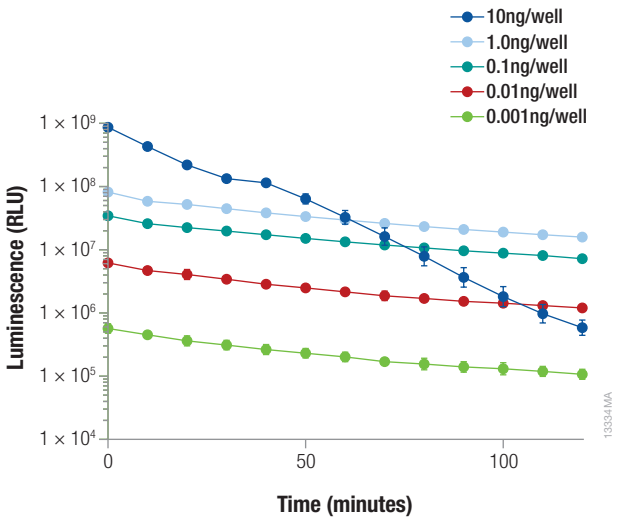


图 2. 监测 HEK293 细胞中 Nano-Glo® Live Cell Reagent 的信号稳定性。用不同量的编码 NanoLuc® 萤光素酶的 pNL1.1.CMV [Nluc/CMV] 载体转染 HEK293 细胞。24 小时后，将细胞培养基换成 Opti-MEM®I 减血清培养基，随后加入 Nano-Glo® Live Cell Reagent。在 37℃下于图中所示的时间点进行发光检测。使用 Transfection Carrier DNA（目录号 E4881）使每孔转染的 DNA 总量（50ng）保持恒定。n=3；误差线代表标准偏差。

其他实验操作步骤的信息请参考技术手册 #TM461，可在线访问 www.promega.com