

NBA-Glo™ HiBiT Extracellular Assay System

NBA-Glo™ 微分裂荧光素酶细胞外检测试剂盒说明书

(L2101, L2102, L2103)

一. 产品描述

微分裂荧光素酶技术 (Nanoluc split enzyme technology) 将荧光素酶蛋白分子分成两个不同的片段, 分别表达, 两个片段具有高亲和力, 在同一反应体系中可以快速自动生成具有荧光素酶活性的完整的酶分子。检测微分裂荧光素酶活性可以用于细胞内目标蛋白的表达水平, 相互作用, 动态变化等研究。微分裂荧光素酶细胞外检测试剂盒 (NBA-Glo™ HiBiT Extracellular Detection System) 提供细胞非裂解缓冲液, 反应底物, 而反应体系的分裂荧光素酶小片段则克隆在表达载体上, 并与目标蛋白表达在同一分子上, 作为目标蛋白分子的标签, 该目标蛋白是分泌型的或存在于细胞膜胞外。带分裂荧光素酶小片段标签的目标蛋白表达载体由用户构建, 制备, 并完成对细胞的转染。

二. 产品组成

缓冲液, 底物分别混灌装于 10 ml 或 100 ml 的棕色瓶及 2ml 的螺旋管中, 规格如下:

目录号	缓冲液	底物	检测的 96-孔板 孔数	检测的 384-孔板 孔数
L2101	10 ml	100μl	100 wells	500 wells
L2102	100 ml	1ml	1,000 wells	5,000 wells
L2103	10X100 ml	10X1 ml	10,000 wells	50,000 wells

三. 实验步骤

1. 在 96 孔或 384 孔细胞培养板铺合适密度的待检测细胞, 转染合适质粒或带有分裂荧光素酶小片段标签的目标蛋白表达载体的稳定细胞株。建议使用白板。
2. 根据项目需求对细胞进行相关处理, 并继续培养合适的时间。
3. 取出检测缓冲液, 在室温平衡 20 分钟。快速 spin 底物管 10 秒钟, 将内容物收集于管底, 放置在冰盒上。
4. 取出待测细胞培养板, 在室温平衡 20 分钟。

5. 准备 1x 的检测工作液：根据实验需求确定配制的试剂量。配制时将需要的底物及分裂酶大片段（用户自供，**最佳浓度需优化**）按量比加到缓冲液中，充分混匀。试剂盒中底物是 100x，建议分裂酶大片段浓度为 50x，使用前用缓冲液稀释成 1x 的检测工作液。注意避光。
6. 向待检反应孔里加入等体积的 1x 的检测工作液，轻轻振荡 30 秒钟。
7. 在 luminescence 读板仪上读取荧光信号。保存数据。进行数据处理分析。
8. 未使用完的试剂放回-20℃冰箱保存。

四. 储存条件

储存 NBA-Glo™ 微分裂荧光素酶细胞外检测试剂盒于-20℃ 或以下。避免冻融次数超过 3 次以上。加了底物的缓冲液可存于 4℃ 不超过 2 小时。检测工作液不能长期保存再用。

五. 其它注意事项 (供参考)

1. 试剂量：非经严格验证，不建议随意改变反应试剂用量。试剂量不要低于检测前实际培养液的体积。对 96 孔培养板而言，建议检测前实际培养液体积为 50~100μl/孔，必要时可以适当调整。如果待检测目标蛋白是跨膜蛋白，也可以吸去培养液，直接加 1x 的检测工作液进行检测。
2. 读板时间：建议在 5~30 分钟内完成读板以获得最佳结果。
3. 板间内参：如果需要进行板间数据比较，建议在所有反应板均设立两孔未加化合物的阳性对照作为板间内参，用板间内参读数对每块板读数先进行纠正（normalization），纠正后的数据再进行下游处理分析。
4. 反应板：荧光读数高低可能对临近周围孔读数形成明显干扰，主要是荧光信号外溢。建议使用透明底的白板。
5. 试剂混合：不同批次的试剂，已经启用但未使用完而储存试剂及条件差别比较明显的试剂，不建议混合后使用。
6. 分装储存：按照说明书分装储存反应试剂，保证试剂的稳定性。