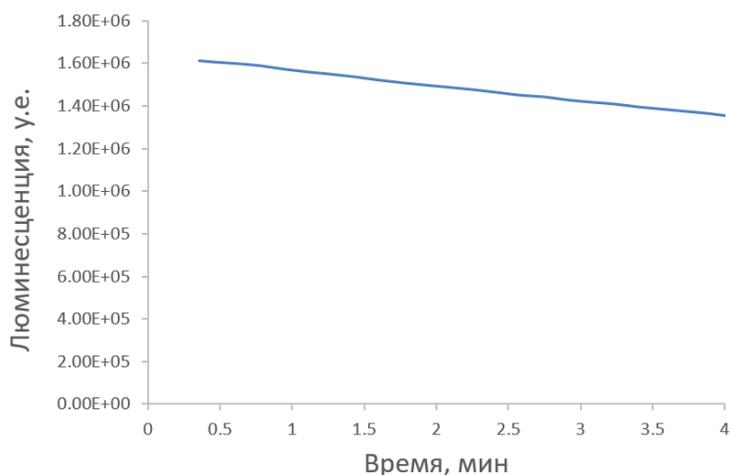


Руководство по использованию реактивов серии LuciFire™ (ЛюциФаер™) для детекции биолюминесцентной активности Люциферазы светлячка.

Описание

Реактивы серии LuciFire используются для детекции биолюминесцентной активности фермента Люциферазы светлячка в *in vivo* и *in vitro* системах. Детекция основана на окислении ферментом Люциферазой светлячка синтетического субстрата D-Люциферина в присутствии АТФ и ионов Mg^{2+} . Наличие в составе реактива Коэнзима-А (LuciFire-РБ) стабилизирует сигнал биолюминесценции и продлевает эффективное время детекции.

Кинетика люминесцентной реакции окисления D-Люциферина лизатом клеток НЕК293Т, гиперэкспрессирующих фермент Люциферазу светлячка, с использованием системы детекции LuciFire-10.



Набор для детекции LuciFire является функциональным аналогом реагентов One-Glo™ (Promega).

Доступные реактивы и наборы

Кат. номер		Кол-во реакций*
• <u>Люци-1</u> D-Люциферин, 1 г	Чистый субстрат для in-vivo и in-vitro определения Люциферазы светлячка	
• <u>LuciFire-ДБ-10</u> Детектирующий Буфер, 10 мл	Буфер для приготовления Рабочего Раствора Субстрата D-Люциферина для in-vitro детекции Люциферазы Светлячка	100
• <u>LuciFire-ДБ-100</u> Детектирующий Буфер, 100 мл	Буфер для приготовления Рабочего Раствора Субстрата D-Люциферина для in-vitro детекции Люциферазы Светлячка	1000
• <u>LuciFire-10</u> - LuciFire-ДБ-10 Детектирующий Буфер, 10 мл - LuciFire-Суб-10 Лиофилизированный субстрат D-Люциферин, 1 флакон	Набор для in vitro определения Люциферазы Светлячка.	100
• <u>LuciFire-100</u> - LuciFire-ДБ-10 Детектирующий Буфер, 10 мл * 10 шт. - LuciFire-Суб-10 Лиофилизированный субстрат D-Люциферин, 10 флаконов	Набор для in vitro определения Люциферазы Светлячка.	1000

* в формате 96-луночного планшета из расчета 100 мкл рабочего раствора на 1 образец

Сокращения

ДБ – детектирующий буфер

РРС – рабочий раствор субстрата

ЛБ – лизирующий буфер

ЛБМ – лизирующий буфер для клеток млекопитающих

Дополнительные используемые реактивы

Вода milliQ, буфер PBS, буфер с pH 7.4-8.0 (PBS, 50-100 mM Tris-HCl, HEPES или другая буферная система).

Транспортировка

Рекомендуемая температура транспортировки всех реактивов серии LuciFire -15°C -25°C . Допускается транспортировка новых наборов при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ $+25^{\circ}\text{C}$.

Хранение

Сухой D-Люциферин (кат. номер Люц-1, Лиофилизированный субстрат LuciFire-Суб-10 в наборах LuciFire-10/100) хранить при температуре $< -20^{\circ}\text{C}$.

Закрытые наборы LuciFire-10/100 хранить при температуре $< -20^{\circ}\text{C}$.

Детектирующий буфер LuciFire-ДБ допускается транспортировать и хранить при комнатной температуре. Во избежание бактериального зароста после вскрытия флакона рекомендуемая температура хранения $+4^{\circ}\text{C}$. Также возможно хранение при температуре $< -20^{\circ}\text{C}$.

Растворенный субстрат D-Люциферин теряет активность в процессе хранения. В связи с этим для измерения рекомендуется использовать свежеприготовленный Рабочий Раствор Субстрата (PPC) или свежеразмороженные аликвоты PPC. PPC и другие растворы субстрата D-Люциферина хранить при температуре $< -20^{\circ}\text{C}$. Рекомендуется хранение в низкотемпературном морозильнике при температуре $-70/-85^{\circ}\text{C}$. Избегать перемораживания.

Методика измерения активности фермента Люциферазы Светлячка *in vitro*

1. Приготовьте Рабочий Раствор Субстрата - РРС

а. Для наборов LuciFire-10/100:

Добавьте содержимое 1 флакона 10 мл **Детектирующего Буфера** (LuciFire-ДБ-10) во флакон с лиофилизированным субстратом D-Люциферином LuciFire-Суб-10. Перемешайте до полного растворения переворачиванием флакона.

б. Для Люц-1 и LuciFire-ДБ:

- Приготовьте 100х **стоковый раствор** D-Люциферина*:

- K^+/Na^+ соль D-Люциферина растворите в воде до концентрации 50 мМ;
- Люц-1 (D-Люциферин в виде кислоты) растворите в воде (50 мМ, 14 мг/мл) с титрованием раствором $KHCO_3$ ($NaHCO_3$) до полного растворения D-Люциферина**.

- Для приготовления **РРС** добавьте 99 объемов **Детектирующего Буфера** (LuciFire-ДБ) к 1 объему приготовленного 100х **стокового раствора** D-Люциферина.

* **Стоковый раствор** D-Люциферина и **РРС** хранить замороженными в аликвотах при $-70^\circ C$ до 1 года. Допускается хранение при $-20^\circ C$ до 3 месяцев. Перед началом анализа свежеприготовленный/свежеразмороженный **РРС** необходимо довести до комнатной температуры.

** Растворение D-Люциферина в форме кислоты достигается при смешивании в водном растворе 1 mol.eq. D-Люциферина с 2 mol.eq. $KHCO_3$ (например, для полного растворения до 50 мМ D-Люциферина требуется ~100 мМ раствор $KHCO_3$).

2. Смешайте в кювете/ячейке планшета образец и РРС в соответствии с форматом измерения:

Для измерения *in vitro* в люминометре на 1 кювету:

- а. Определите минимальный допустимый объем образца в кювете: зависит от кювет и устройства люминометра. Рассчитайте объем PBS* буфера, который необходимо добавить в кювету для измерения, по формуле:

$$V_{\text{буфера}} = V_{\text{измерения минимальный}} - 100 \text{ мкл (объем добавляемого РРС)}$$

- б. Внесите в кювету PBS буфер в объеме $V_{\text{буфера}}$.
- с. Внесите в кювету от 5 до 100 мкл образца (рекомендованный объем 10 мкл).
- д. Внесите в кювету 100 мкл **РРС** и тщательно перемешайте пипетированием.

*Вместо PBS для доведения до минимального допустимого объема в кювете может быть использован любой другой буфер (например, 50-100 мМ Tris-HCl или HEPES с pH 8.0). Хотя PBS

имеет рН 7.4, его использование допускается, т.к. РБ имеет бóльшую буферную емкость, благодаря чему конечный рН смеси будет составлять ~7.7.

Примечание: система LuciFire линейно детектирует Люциферазу в пределах нескольких порядков по концентрации фермента, при этом через использование разного объема образца можно оптимизировать уровень сигнала до комфортного уровня: достаточно высокий для приемлемого уровня соотношения сигнал/шум, но не слишком высокий для сохранения линейного диапазона используемого люминометра, а также для экономии материала образца..

Для измерения в формате 96-луночного планшета с ручным внесением:

- a. Внесите в лунку 100 мкл РРС.
- b. Внесите в лунку от 5 до 30 мкл образца (рекомендованный объем 10 мкл). Перемешайте пипетированием, избегать вспенивания.
- c. Измерьте люминесценцию в течение 5-10 сек на лунку*.

* Необходимо учитывать, что несмотря на гораздо более стабильный сигнал люминесценции при использовании LuciFire-РБ по сравнению с немодифицированными коэнзимом А буферами, падение уровня сигнала составляет 4-7%/мин. Учитывайте данный факт при необходимости измерения люциферазы в полном 96-луночном планшете, когда между измерением первого и последнего образца может пройти 6-10 мин. При таких вводных, добавление образца и измерение можно проводить сериями по 5-10 лунок.

Примечание: Также измерение возможно в любом другом формате (например, 384 луночный планшет позволяет проводить измерения через смешивание 20 мкл РРС и 2-5 мкл образца).

Примечание: Допускается внесение разных объемов измеряемых образцов в разные лунки, однако в этом случае обязательным условием сравнимости результатов является сохранение суммарного объема реакции. Разницу в объемах между лунками (например, в одну лунку внесено 10 мкл образца, а в соседнюю лунку – 50 мкл образца) необходимо компенсировать тем же буфером, в котором растворены образцы.

Для измерения в формате 96-луночного планшета для люминометра с инжектором:

- a. Разбавьте образцы в 5 раз PBS буфером (или любым другим буфером с рН 7,4-8) и внесите в лунку от 25 до 100 мкл образца.
- b. Внесите в лунку 100 мкл РРС через инжектор и записывайте сигнал люминесценции в течение 5-10 сек.

Использование DTT, ЭДТА, БСА, консервантов

По умолчанию, в качестве консерванта в ДБ используется смесь ПенСтреп (Пенициллин/Стрептомицин). Если требуется ДБ без добавления ПенСтреп, укажите это требование в заказе.

ДБ в составе LuciFire не имеет в своем составе DTT, ЭДТА или БСА. Если условия эксперимента требуют введения этих компонентов, мы рекомендуем добавлять их к образцам на стадии пробоподготовки (например, в составе лизис буфера), т.к. это является гораздо более эффективным способом их применения.

DTT используется для стабилизации фермента как в процессе выделения, так и в процессе реакции с субстратом. Причем, добавление DTT имеет гораздо больший смысл для процесса выделения, чем его добавление в ДБ или РСС. DTT является чрезвычайно лабильным реагентом. Для сохранения его активности требуется приготовление, в идеальном случае, свежих растворов из сухого DTT. Также допускается приготовление стоковых аликвотированных растворов DTT с хранением на $-20/-80^{\circ}\text{C}$. Добавлять DTT в рабочие буферы следует непосредственно перед использованием. В противном случае, единственным эффектом добавления DTT будет запах, тогда как активность DTT как восстановителя будет уже по большей части потеряна. Стандартная концентрация DTT в конечном образце Люциферазы составляет 1 мМ.

Аналогичным образом, добавление БСА (например, до 0.2-1 мг/мл) имеет смысл проводить не в ДБ/РСС, а в измеряемый образец в процессе его подготовки (например, при выделении белка или лизиса клеток). Задачей БСА является снижение неспецифической сорбции белков (включая Люциферазу) на стенки пробирок за счет блокирования сайтов неспецифического связывания [1]. Степень неспецифической сорбции белков на пластик весьма ограничена, поэтому эффект неспецифической сорбции будет проявляться только для сильно разбавленных растворов. Добавлять БСА в ДБ/РСС, по большому счету, бессмысленно. Люцифераза проявляет практически неизменную активность даже будучи сорбированной на стенки пробирок/планшета. Соответственно, после смешивания образца с Люциферазой с РСС в кювете/лунке сорбция фермента на материал кюветы/лунки на сигнал уже никак не повлияет. В то же время, отсутствие компенсации неспецифической сорбции на пластике на предшествующих стадиях пробоподготовки вполне может привести к сильному снижению или исчезновению фермента из образца к моменту его смешивания с РСС.

Добавление ЭДТА к ДБ/РСС имеет смысл в том случае, если образцы для анализа содержат посторонние двухвалентные ионы, в частности, ионы Pb^{2+} , Cd^{2+} или Hg^{2+} , которые блокируют активность Mg-зависимых ферментов, в частности, Люциферазы. Добавлять ЭДТА в рабочую смесь необходимо в более низких концентрациях, чем MgSO_4 , чтобы не препятствовать работе фермента через полную адсорбцию ионов Mg^{2+} из раствора. При этом посторонние двухвалентные ионы будут связываться с ЭДТА гораздо сильнее, чем Mg^{2+} , и таким образом, убираться из смеси даже при одновременном присутствии избытка ионов Mg^{2+} . Стандартной рабочей концентрацией ЭДТА для ДБ является 1-2 мМ.

Таким образом, использование вышеперечисленных компонентов не является обязательным и их отсутствие никак не повлияет на процесс детекции Люциферазы в абсолютном большинстве случаев. При ожидаемой низкой концентрации и длительном нахождении образцов Люциферазы в жидком виде (например, при длительном процессе выделения/пробоподготовки), можно рекомендовать добавлять БСА и ДТТ для стабилизации растворов фермента. ЭДТА имеет практический смысл в исключительных случаях наличия контаминирующих двухвалентных ионов-ингибиторов и в обычной жизни встречается редко. В то же время, наличие ЭДТА в ограниченных количествах никак не может помешать реакции, поэтому потенциально ЭДТА можно вводить в состав РБ по умолчанию.

Данное руководство в электронном виде, а также дополнительную информацию можно найти на сайте www.molecta.ru.