

EZ™ Luciferase Assay System

제품설명서

Kit for 100 assays

Cat# EZ040S

For research use only. Not for therapeutic or diagnostic purposes

목 차

I. 제품설명.....	3
II. 제품구성 및 보관조건	4
III. 실험준비.....	5
IV. 실험방법.....	5
V. 주의사항.....	7

I. 제품설명

EZ™ Luciferase Assay Kit 는 일반적인 실험방법 대비 감도를 높이고 안정성을 향상시킨 제품으로 firefly luciferase 를 이용한 mammalian, plant, bacteria cell 에서의 reporter assay 에 적합하도록 만들어진 제품입니다. Lysis buffer, Reaction buffer, 분말 형태의 기질로 간단히 구성하여 편리성을 높였습니다. Transfection 후 세포 내에서 발현된 firefly luciferase 는 lysis buffer 의 작용으로 용출되어 reaction buffer 에 포함된 기질인 D-luciferin 의 산화를 촉진하고, 그 결과 oxyluciferin 이 생성되면서 동시에 빛이 발생하게 됩니다. 발생한 빛은 빠르게 불안정해지기 때문에 샘플 간의 오차가 큰 기존의 실험방법을 보완하고자 coenzyme A 를 사용하여 효소 회전을 증가시켜 1분 이상 일정한 광도를 유지할 수 있도록 빛의 안정성을 높였습니다.

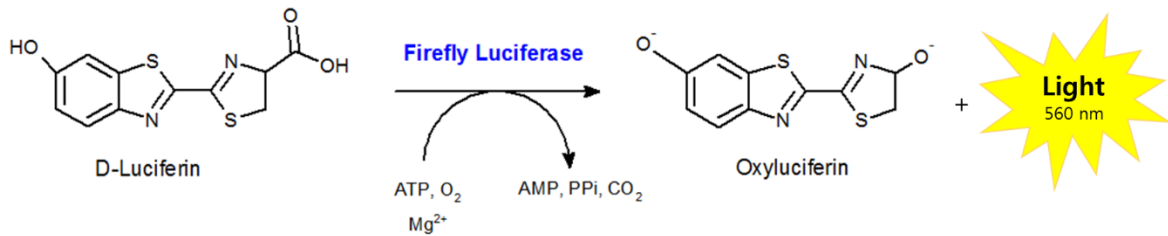


그림 1. Firefly luciferase 에 의한 bioluminescent 반응 모식도

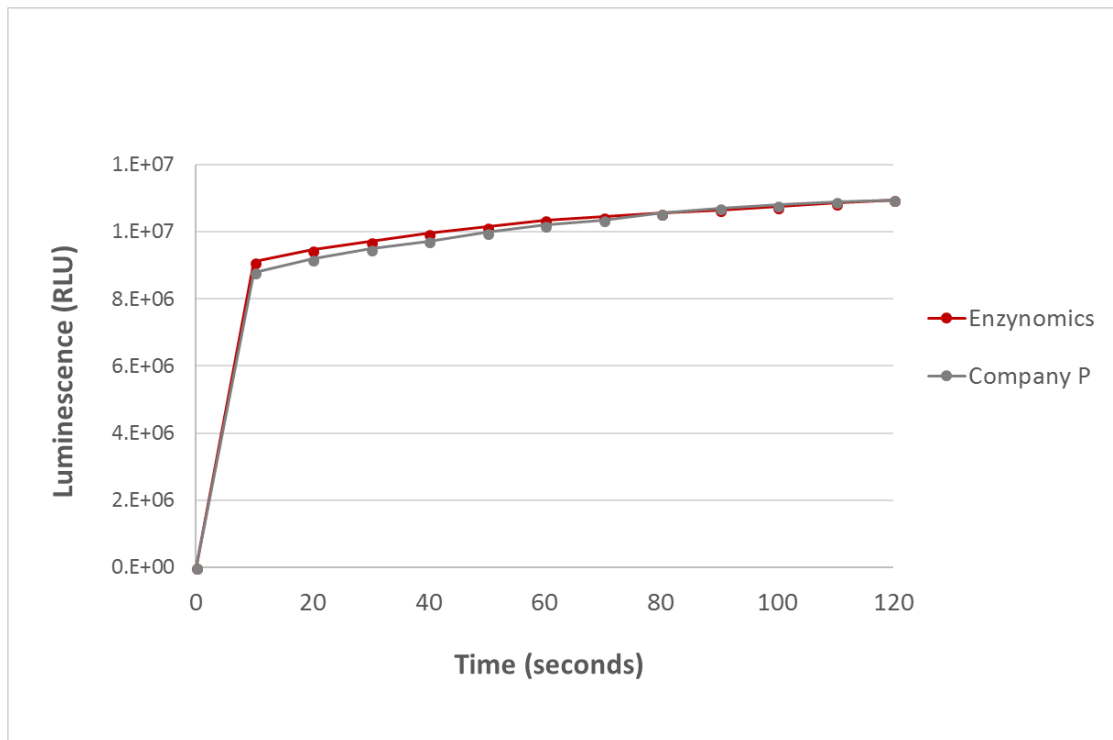


그림 2. Lysate-Reaction buffer 반응 후 2분 동안의 signal 변화

II. 제품구성 및 보관조건

1. 제품구성

Product	Size	Cat#
EZ™ Luciferase Assay System	100 assays	EZ040S

Composition	Volume
Luciferase Reaction Buffer	10 ml
Luciferase Assay Substrate (Dry type)	1 vial
5X Luciferase Cell Culture Lysis Buffer	30 ml

2. 보관조건

1) Luciferase Reaction Buffer

- Luciferase Assay Substrate를 Luciferase Reaction Buffer 로 녹인 이후에는 -20℃ 보관 시 1개월, -70℃ 보관 시 1년간 사용하실 수 있습니다.
- 빛이 없는 조건에서 보관하시고 동결-해동을 반복하지 마십시오.

2) 5X Luciferase Cell Culture Lysis Buffer

- 항상 사용 직전에 1X 로 제조하여 신선한 상태로 사용하십시오

III. 실험준비

1. Luminometer 장비의 Linear range 설정

샘플이 너무 강한 광도를 가질 경우 장비의 측정 한계치를 초과할 수 있기 때문에 실험 전 linear range 를 설정하는 일은 중요합니다. Luciferase 농도대비 빛의 세기에 대한 표준 곡선을 제작하기 위해서 cell lysate 나 정제된 Luciferase 를 1 mg/ml 농도로 BSA 가 첨가된 1X Lysis Buffer 를 이용하여 농도별로 희석하여 준비하십시오. BSA 는 용액 내에서 luciferase 가 손실되는 것을 방지 합니다. 정제된 Luciferase 는 당사에서 구매할 수 있습니다. (EZ™ Recombinant Luciferase (Thermostable), Cat#M038)

2. Luciferase Reaction Buffer 준비

반응에 사용되는 기질인 D-Luciferin 은 건조된 분말 형태로 제공됩니다. 사용 전 Luciferase Assay Substrate 용기에 Luciferase Reaction Buffer 10 ml 을 넣고 완전히 섞어줍니다. 동결-해동 반복을 방지하기 위하여 녹인 후 일정량씩 분주하여 -80°C 조건에서 보관하시는 것을 권장합니다. Substrate 과 혼합된 Luciferase Reaction Buffer 는 반응 당 100 μ l 가 필요합니다. 실험 전 사용하실 만큼만 상온으로 꺼내 놓으십시오.

3. 5X Luciferase Cell Culture Lysis Buffer

이 lysis buffer 는 1분 안에 효율적으로 샘플을 lysis 할 수 있습니다. 사용 전 1X 가 되도록 5X Luciferase Cell Culture Lysis Buffer 를 sterile water 로 희석하여 준비합니다.

IV. 실험방법

1. Cell lysate 준비

1) Mammalian cell lysis 방법

- ① 사용자에게 따라 제작된 luciferase reporter vector 를 transfection 하여 배양한 cell 을 준비합니다.
- ② 배양된 cell 의 growth media 를 조심스럽게 제거합니다. PBS 로 cell 이 떨어지지 않도록 천천히 행군 후 PBS 를 최대한 제거합니다.
- ③ Dish 표면을 완전히 덮도록 충분한 양의 1X Luciferase Cell Culture Lysis Buffer 를 넣습니다. (60mm culture dish 인 경우 400 μ l, 100mm culture dish 인 경우 900 μ l, 96 well plate 인 경우 well 당 20 μ l 가 적합합니다).
- ④ Dish 를 흔들어 lysis buffer 가 dish 표면을 채우도록 한 후 cell 을 긁어냅니다. 1.5 ml tube 로 전부 옮기고 ice 에 놓습니다.
- ⑤ 1.5 ml tube 를 10~15 초간 vortexing 합니다. 4°C에서 2분 또는 상온에서 15 초간 12,000 x g 조건으로 원심분리 합니다.
- ⑥ 상층액을 새로운 tube 로 옮긴 후 실험 전 까지 -70°C에서 보관합니다.

2) Plant • Bacterial cell lysis 방법

- ① Plant tissue: 액화질소에 급속 냉각하여 가루로 분쇄한 후 1X Luciferase Cell Culture Lysis Buffer 를 적정량 넣습니다. 일부 남아있는 조각들을 제거하기 위하여 짧게 원심분리 하고 상층액을 새로운 tube 로 옮깁니다.
- ② Bacterial cell: 형질 전환된 배양액 50 μ l 와 형질전환 되지 않은 배양액 40 μ l 를 혼합하고 1 M K_2HPO_4 와 20 mM EDTA 를 10 μ l 넣습니다. Dry ice 에서 급속 냉각하고 상온에 놓은 후 1X Luciferase Cell Culture Lysis Buffer 300 μ l 를 넣습니다. 10 분간 상온에서 반응합니다.

2. Luminometer 측정

- 빠른 반응이 일어날 수 있도록 실험 전 lysate 샘플과 Luciferase Reaction Buffer 를 반드시 상온에 두십시오.
- Luminometer 장비를 이용한 lysate 샘플의 분석은 single tube 와 96 well plate 모두 가능하며 injector 장착유무와 관계없이 사용이 가능합니다.
- 모든 샘플의 측정시간은 10 초로 설정하고 샘플간 측정간격은 2 초로 설정하십시오.
- Luciferase Reaction Buffer 와 cell lysate 가 혼합되는 순간부터 반응은 시작되며 1 분간 지속된 후 서서히 감소하여 대략 10 분이 경과하면 절반 이하의 signal 로 감소합니다.

1) Manual Luminometer (Injector 없는 모델) 를 이용한 측정방법

- ① 1 tube (또는 1 well) 당 100 μ l 의 Luciferase Reaction Buffer 를 넣습니다.
- ② 샘플 당 10 초씩 2 초간격으로 측정하도록 프로그램을 설정합니다. 샘플이 충분한 빛을 내보낼 경우 측정시간은 더 짧아질 수 있습니다.
- ③ Luciferase Reaction Buffer 가 들어있는 tube 에 20 μ l 의 cell lysate 를 넣고 피펫으로 2~3 회 짧게 혼합한 후 장비에 넣고 측정합니다.

2) Injector 가 장착된 Luminometer 를 이용한 측정방법

- ① 사용자 매뉴얼에 따라 Luciferase Reaction Buffer 를 injector 에 프라임 하십시오.
- ② 측정용 튜브 또는 plate well 1 개당 20 μ l 의 cell lysate 를 넣으십시오.
- ③ 샘플 당 10 초씩 2 초간격으로 측정하도록 프로그램을 설정합니다. 샘플이 충분한 빛을 내보낼 경우 측정시간은 더 짧아질 수 있습니다.
- ④ 준비된 cell lysate 를 장비에 넣고 100 μ l 의 Luciferase Reaction Buffer 를 주입하여 측정을 시작하십시오.

V. 주의사항

1. 실험과정에서의 주의사항

- 측정되는 빛의 세기는 luciferase 효소의 반응 결과물이기 때문에 온도의 영향을 많이 받습니다. 활성에 최적의 온도는 상온 (20~25°C) 입니다. Luciferase Reaction Buffer 를 실험전에 30 분 정도 상온으로 두어 반응 주변온도에 맞추시는 과정을 필히 수행하십시오.
- Cell lysate 또한 반응 전 상온으로 맞추어야 합니다. Luciferase 활성은 상온에서 수 시간 동안 안정합니다. 4°C 이하의 cell lysate 를 사용할 경우 5~10% 정도 활성이 감소할 수 있습니다.
- 구성품인 5X Luciferase Cell Culture Lysis Buffer 는 Firefly luciferase 만을 사용하는 single assay 에 적합합니다. CAT, β -galactosidase, *Renilla* luciferase Co-expression 실험을 수행하시는 경우는 이 버퍼의 사용을 권장하지 않습니다.
- 샘플양이 많은 경우는 multi-well plate 를 사용하는 것이 편리합니다.

2. 측정 장비 조건

Luciferase assay 에 주로 사용되는 장비는 luminometer 와 scintillation counter 입니다. Luminometer 의 경우 10^{-20} mole 까지의 luciferase 활성을 측정할 수 있는 높은 감도를 갖고 있는 반면 scintillation counter 의 경우 상대적으로 민감도가 낮습니다. 장비 별 검출 한계 값은 차이가 크기 때문에 장비마다 샘플의 측정값이 항상 linear range 범위안에 드는지 검증한 후 실험을 진행해야 합니다. Linear range 를 확인하는 실험에는 일반적으로 10^{-20} 에서 10^{-13} mole 의 luciferase 를 사용하시는 것이 효율적입니다.

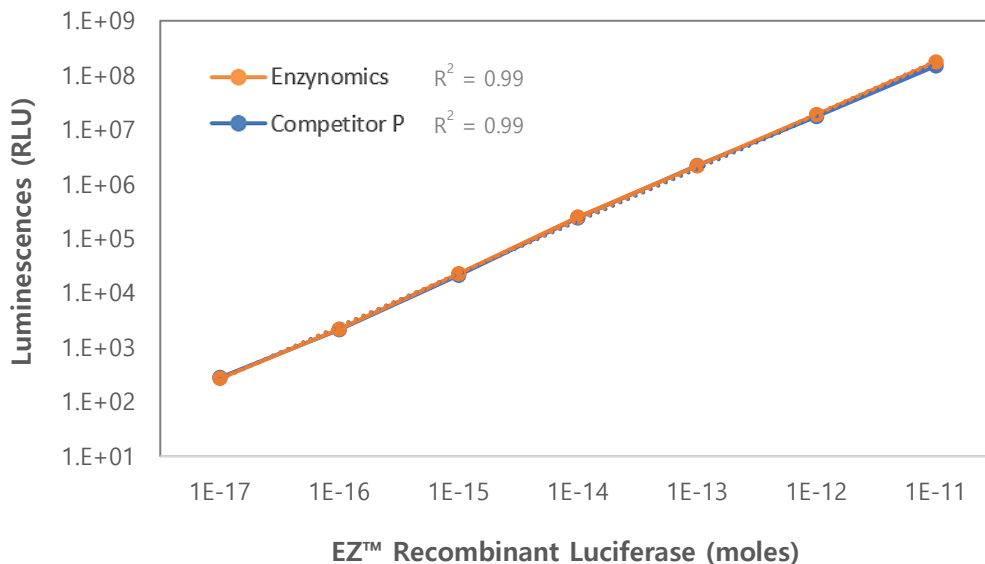


그림 3. GloMax96 Luminometer 를 이용한 recombinant luciferase 농도 별 활성 측정.

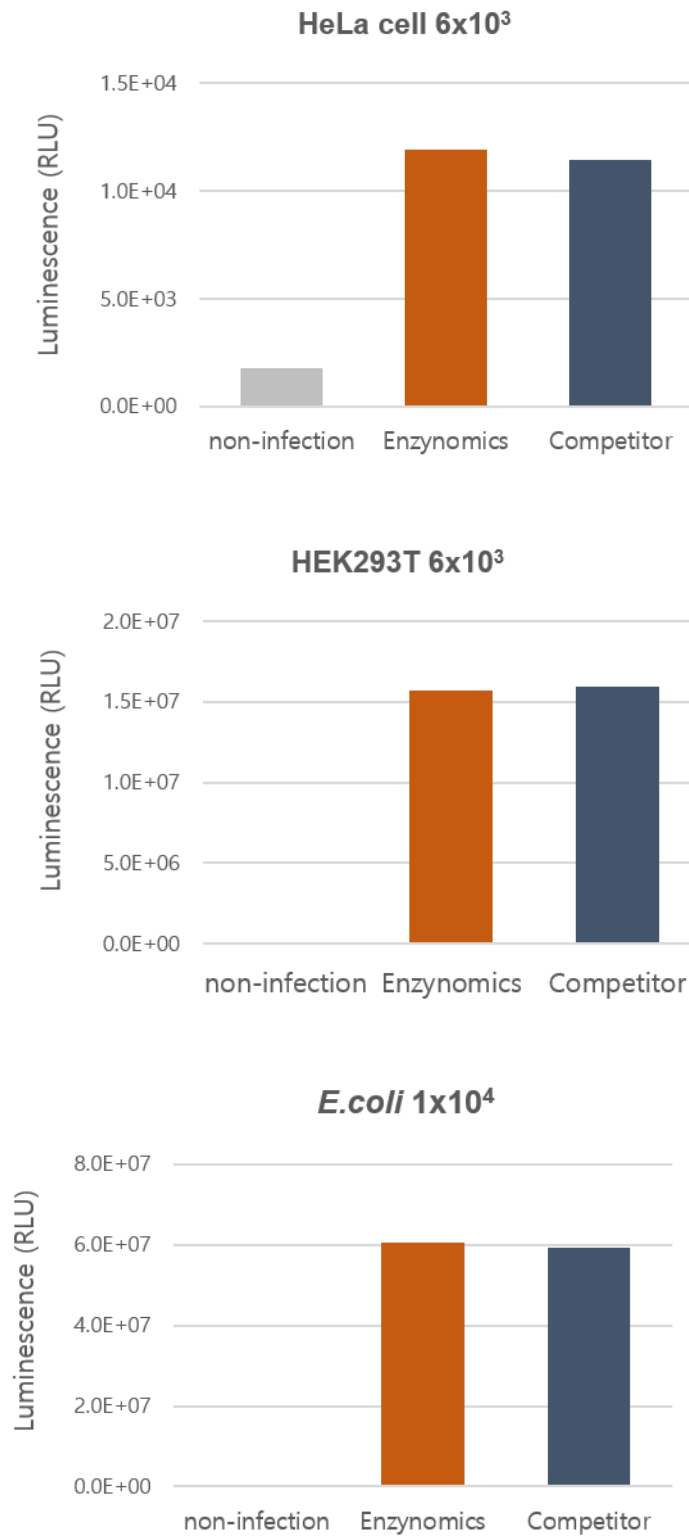


그림 4. 세포 종류별 활성 측정