

Nano-Glo™ Luciferase Assay

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS N1110, N1120, N1130, N1150

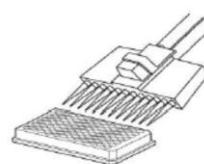
Quick
PROTOCOL

Nano-Glo™ Luciferase Assay Reagent の作成 (用事調製)

1. Nano-Glo™ Luciferase Assay Substrateをピペッティングで混合する。
2. Nano-Glo™ Luciferase Assay Bufferを融解する。
3. Nano-Glo™ Luciferase Assay Substrateに対して50倍量のNano-Glo™ Luciferase Assay Bufferを混合する。例えば10mlのReagentが必要な場合、10mlのbuffer に200 μ lのAssay Substrateを加える (用事調製)。

A. 標準型プロトコール

1. Nano-Glo™ Luciferase Assay Reagent およびサンプル(細胞)をインキュベーターから出し、5-10 分間静置して室温に戻す。
2. 培地に対して等量の Nano-Glo™ Luciferase Assay Reagentを加え、緩やかに混合する。
3. 3 分間インキュベートする。
4. ルミノメーターで発光値を測定する。



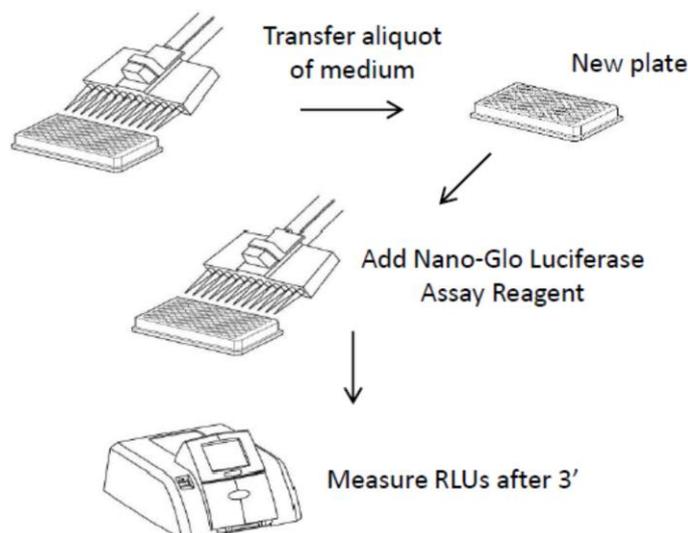
Add Nano-Glo Luciferase Assay Reagent



Measure RLUs after 3'

B. 分泌型プロトコール

1. Nano-Glo™ Luciferase Assay Reagent を 5-10 分間静置して室温に戻す。
2. プレートをインキュベーターから出し、緩やかに振盪あるいは、Orbital Shaker を用いて 100rpm で 2 分間振盪する。
3. 培地 (5–20 μ l) を測定用の 96-well plate に移す。
4. 蒸留水、脱イオン水または培地を 100 μ l/well になるように加える。
5. ウェルに 100 μ l の Nano-Glo™ Luciferase Assay Reagent を加え、混合する。
6. 3 分間インキュベートする。
7. ルミノメーターで発光値を測定する。



[プロトコール例]

pNL3.2.NF-κB-RE [NlucP/NF-κB-RE/Hygro] Vectorを用いてTNF-αによる応答刺激を検出

用意するもの

- HEK 293細胞
- 0.05% (w/v) トリプシン
- DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (DMEM/FBS)
- Tumor necrosis factor-α (TNF-α) (Sigma T0157), 10μg/ml solution in PBS containing 1mg/ml BSA
- Nano-Glo™ Luciferase Assay System (Cat. # N1110)
- Transfection reagent (参考 : FuGENE® HD Transfection Reagent, Cat. # E2311)
- pNL3.2.NF-κB-RE[NlucP/NF-κB-RE/Hygro] Vector

Day 1: 細胞の播種

1. HEK 293細胞を約75%コンフルエントまで培養する。
2. トリプシン処理で細胞を剥がし、15,000 viable cells/100μl DMEM/FBSの濃度に調製する。
3. 96-well plateに100μlずつ播種する。
4. 37°C CO₂インキュベーターで一晩培養する。

Day 2: トランスフェクション

1. トランスフェクション試薬 (参考 : FuGENE® HD Transfection Reagent, Cat.# E2311)を用いて、pNL3.2.NF-κB-RE [NlucP/NF-κB-RE/Hygro] Vectorを細胞に導入する。
(条件例) FuGENE® HD Transfection Reagent : DNA=3 : 1、0.1μg DNA/well
2. 37°C CO₂インキュベーターで一晩培養する。

Day 3: TNFαによる誘導および発光測定

1. 1X induction solutionと1X control solutionを調製する。
 - 1X induction solution : 10μg/ml TNF-αを最終濃度20ng/ml in DMEM/FBSになるように調製する。
 - 1X control solution : DMEM/FBS.
2. ウェルから培地を除き、1X induction solution または 1X control solutionに交換する。
3. 37°C CO₂インキュベーターで5時間培養する。
4. ルシフェラーゼ活性をNano-Glo™ Luciferase Assay System (Cat.# N1110)で測定する。
5. 以下のようにFold Induction (誘導倍率) を計算する。

$$\text{Fold Induction} = \frac{\text{Average relative light units of induced cells}}{\text{Average relative light units of control cells}}$$

