

RealTime-Glo™ & NADP/NADPH-Glo™ multiplex assay

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS G9711, G9712, G9713, G9081 and G9082

1. 細胞培養表面処理済みの 96well 白クリアボトムプレートもしくはソリッドプレートに任意の細胞数で 50 μ L ずつ播種する。
また、バックグラウンドとして、細胞を含まない培地だけの well も準備する。
2. 翌日、下記の表を参考に RealTime-Glo™ とテスト化合物を含む培地を調製する。

Component	volume	x サンプル数	= 合計
培地, 2x テスト化合物	49.8 μ L		
MT Cell Viability Substrate	0.1 μ L		
NanoLuc® Enzyme	0.1 μ L		
Final volume per sample	50 μ L		

3. 50 μ L の RealTime-Glo™ 試薬とテスト化合物を含む培地を細胞に添加する。
4. 37°C インキュベーターにて、10 分以上培養する。
5. 任意のタイムポイントにて、発光測定する（72 時間まで繰り返し測定可能）。
6. RealTime-Glo™ の発光測定終了後、培養プレートを 37°C インキュベーターに戻しておく。
7. NADP/NADPH-Glo™ Detection Reagent を調製する。

Luciferin Detection Reagent の調製：

Reconstitution Buffer と Luciferin Detection Reagent を室温に戻す。

Luciferin Detection Reagent のボトルに Reconstitution Buffer を全量加え、ゆっくりと混ぜ、Luciferin Detection Reagent を溶かす。

NADP/NADPH-Glo™ Detection Reagent の調製：

Luciferin Detection Reagent を室温に戻す。

Reductase と Reductase Substrate を NADP Cycling Substrate を室温で溶かし、使用するまで氷中においておく。

275 μ L の滅菌水を NADP Cycling Enzyme のバイアルに加え、ゆっくりと混ぜ、NADP Cycling Enzyme を溶かす。溶解後は氷中においておく。

下記の表を参考に、NADP/NADPH-Glo™ Detection Reagent を調製する。

例)

Component	Volume	x サンプル数	= 合計
Luciferin Detection Reagent	1 mL		
Reductase	5 μ L		
Reductase Substrate	5 μ L		
NADP Cycling Enzyme	5 μ L		
NADP Cycling Substrate	5 μ L		

各試薬を加えたのち、5 回転倒混和を行う。

8. 培養プレートをインキュベーターから取り出し、室温に戻したのちに培地を除く。新しい培地もしくは PBS 50 μ L を各 well に加える。
9. NADP/NADPH-Glo™ Detection Reagent 50 μ L を各 well に加え、プレートシェーカー等で穏やかに 1 分間攪拌し、細胞を溶解する。
10. 30-60 分間、室温にてインキュベートした後、発光シグナルを測定する。

(その他の情報)

- RealTime-Glo™ は細胞の種類により、細胞数の測定範囲が異なります。
このため、RealTime-Glo™ のマニュアルを参考に、あらかじめ予備実験を行い、測定できる細胞数を決定してください。
- ステップ 1 で細胞を 100 μ L ずつ播種し、ステップ 2 の前に培地を 50 μ L 除去することも可能です。

この Quick Protocol は TM431、TM400 を基に作成された簡易型のプロトコルです。
最新、詳細なプロトコルについては www.promega.com/protocols/ をご覧ください。