

D-荧光素钾盐 (D-Luciferin)

产品规格:

Component	KS1033	Store
D-荧光素钾 (D-Luciferin)	100mg	-20℃, 一年
说明书	1 份	/

产品说明:

D-荧光素(D-Luciferin)是萤火虫荧光素酶底物, 其量子效率为 0.88, 是 Luminol 的 20 倍。反应原理为镁离子存在下荧光素酶使荧光素与 ATP 反应, 接着它被氧化形成二氧杂环丁烷结构并发出黄绿色的光。Luciferin-luciferase 发光用于 ATP 监控以测定细胞活力以及细菌计数。它还用于报告基因检测。可与小动物活体成像系统配套使用, 用于标记 LUC 基因后的体内活体荧光检测。也应用于体外分析, 高通量测序和各种污染检测。

D-荧光素有三种产品形式, D-荧光素(D-Luciferin, free acid)、D-荧光素钾盐(D-Luciferin, potassium salt)和 D-荧光素钠盐(D-Luciferin, sodium salt), 三种形式都易溶于水, 在绝大多数的应用上都没有实质性的差别。在植物中通常使用 D-荧光素钾盐 (D-Luciferin)。它们的激发和发射波长分别为 328nm 和 533nm。

使用方法(动物, 仅供参考):

(一)活体成像分析方法

- 1.用 DPBS (不含 Mg^{2+} 、 Ca^{2+})配制 15mg/mL 的 D-Luciferin 工作液, 0.2 μ m 滤膜过滤除菌。
- 2.注射量 10 μ L/g 的体重, 如 10g 重小鼠, 注射 100 μ L 工作液(1.5mg D-Luciferin)。
- 3.腹腔注射 10-15min 后, 上机进行图像分析。

(二)体外分析方法

- 1.用无菌水配置 200 \times 的 D-Luciferin 储备液(30mg/mL), PCR 管分装 200 μ L 每, 于 -80 $^{\circ}$ C 避光保存, 或直接使用。
- 2.用预热好的完全培养基 1:200 稀释 D-Luciferin 储备液, 配制 150 μ g/mL 工作液。
- 3.去除细胞培养基后向细胞中添加 1 \times D-Luciferin 工作液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 5-10min, 进行图像分析。

使用方法(植物, 仅供参考):

萤火虫酶活性观察分为定性检测和定量检测, 分别利用植物活体分子影像系统(CCD imaging system)和 luminometer 来进行检测。

本实验借助烟草瞬时表达系统, 将含有融合蛋白的植物表达载体转化农杆菌后注射烟草叶片。24-48h 后, 加入反应底物萤光素, 利用植物活体分子影像系统(CCD imaging system)或 luminometer 来定性定量检测荧光强度, 以判定目标蛋白之间是否存在相互作用及互作的程度。

1 植物活体成像系统定性检测萤火虫酶活性

- (1)选取注射农杆菌 24-48h 后的烟草叶片, 用含 1mmol/L 萤光素底物 D-luciferin 的反应液喷湿叶片背面; 将烟草植株在黑暗中静置 7min。
- (2)截取烟草叶片, 将其反面向上置于培养皿中, 移入植物活体成像系统中检测发光情况。如果有发光, 即说明待测蛋白之间存在互作。为了保证实验的准确性和一致性, 同一株烟草至少选取 3 个重复进行荧光检测。
- (3)根据实验结果调整曝光强度并拍照。

2 luminometer 定量检测荧光强度

- (1)选取注射农杆菌 40-48h 后的烟草叶片, 用打孔器(直径约 0.6cm)打孔, 将烟草圆片转移到含有 200 μ L 无菌水的白色 96 孔酶标板中。为了保证实验的准确性, 同一烟草注射部位至少设 8 个重复。
- (2)用排枪移走 96 孔酶标板内的无菌水, 加入 200 μ L 含有 1mmol/L 萤光素底物的反应液, 孵育 5-10min。在操作过程中移液器的枪头尽量不要触碰叶片, 避免应激反应。
- (3)使用 luminometer 进行荧光扫描, 扫描间隔时间为 0.5s, 25-40 个循环。
- (4)根据扫描的数值绘制柱形图, 以显示萤火虫酶分解底物后产生荧光的强度, 判断目标蛋白之间的互作程度。此实验重复 3 次。

注意事项:

1. 钙镁离子可能会抑制荧光素酶的活性, 镁离子可能会对荧光素的氧化造成影响, 溶解 D-Luciferin 应使用无钙镁离子的 PBS, 且要完全溶解。
2. 本品要严格避光, 储存液于-80 $^{\circ}$ C 冻存。
3. 动物类型体重, 以及注射方式都会影响信号的发射, 建议每次实验都要做荧光素酶动力学曲线, 确定最佳信号平台期和最佳的检测时间。
4. 在体外图像分析前, 将细胞进行 37 $^{\circ}$ C 的短时间培养可以增加信号强度。
5. 进行 ATP 的检测, 尽量避免外源 ATP 的污染。