

双荧光素酶报告基因检测试剂盒

Dual Luciferase Reporter Gene Assay Kit

产品信息

产品名称	产品编号	规格
双荧光素酶报告基因检测试剂盒	DY80213	100T

产品描述

萤火虫荧光素酶 (Firefly Luciferase) 是一种分子量约为 61 kDa 的蛋白, 在 ATP、镁离子和氧气存在的条件下, 能够催化荧光素 (Luciferin) 氧化成 oxyluciferin, 在氧化的过程中会发出波长为 560 nm 左右的生物荧光。海肾荧光素酶 (Renilla Luciferase) 是一种分子量约为 36 kDa 的蛋白, 在氧气存在的条件下, 可以催化腔肠素 (coelenterazine) 氧化成 coelenteramide, 在氧化的过程中会发出波长为 480 nm 左右的生物荧光。两种生物荧光都可通过化学发光仪进行测定。

通常将目的基因的 5'UTR 或启动子克隆至 Firefly Luciferase 的上游, 或 3'UTR 克隆至 Firefly Luciferase 的下游, 通过检测萤火虫荧光素酶的量来检测启动子或调控元件的转录调控作用。Renilla Luciferase 作为内参, 来消除细胞数量、转染效率等的差异。双荧光素酶报告基因检测试剂盒首先以荧光素为底物来检测萤火虫荧光素酶报告基因的活性, 之后在淬灭该荧光反应的同时, 以腔肠素为底物检测海肾荧光素酶报告基因的活性。该试剂盒具有灵敏度高、稳定性好的特点。

产品组成

组分	名称	规格
DY80213-A	1× Passive Luciferase Lysis Buffer	10 mL
DY80213-B	Firefly Luciferase Assay Buffer	10 mL
DY80213-C	D-Luciferin	2 mg
DY80213-D	Renilla Luciferase Assay Buffer	10 mL
DY80213-E	Coelenterazine	400 µg

保存方式

干冰运输。-20°C 保存, 有效期 1 年。将 C 组分溶解到 B 组分后, 该混合液不可反复冻融, 建议进行小批量分装, 并于 -20°C (最长可储存 6 个月) 条件下储存。Renilla Luciferase Assay solution (D+E) 应新鲜配制, 当天使用。

操作说明

1. 裂解细胞

将报告基因细胞裂解液充分混匀后, 按如下方式加入报告基因细胞裂解液, 充分裂解细胞。

1.1) 对于贴壁细胞: 吸尽细胞培养液后, 参考下表加入适量的报告基因细胞裂解液; 对于悬浮细胞: 离心去上清后, 参考下表加入适量报告基因细胞裂解液。

细胞培养板	96 孔板	48 孔板	24 孔板	12 孔板	6 孔板
裂解液加入量	20 µL	65 µL	100 µL	250 µL	500 µL

注: 裂解产物可室温保存 6 h, -70°C 可长期存放 (裂解产物不能反复冻融);

注: 如果荧光素酶的表达水平比较低, 可以尝试使用更少的裂解液, 例如 6 孔板的每孔用量可以最小为 100 µL。

1.2) 充分裂解后, 10,000-15,000g 离心 3-5 分钟, 取上清用于测定。

注: 细胞裂解后可以立即测定荧光素酶, 也可以先冻存, 待以后再测定。冻存样品需融解, 并达到室温后再进行测定。

2. 准备萤火虫荧光素酶工作液

- 2.1) 将所有组分恢复至室温。
- 2.2) 配置 10 mg/mL D-luciferin 储存液。2mg 组份 C 溶解在 200 μ l 超纯水中。储存液-20 $^{\circ}$ C可以储存 6 个月反复冻融 5 次。
- 2.3) 工作液配置：用组分 B 按照 1:50 稀释以上 D-luciferin 储存液，配制成 0.2 mg/mL 的萤火虫萤光素酶工作液。
注：萤火虫萤光素酶工作液不能反复冻融超过 5 次，若单次实验用量较少，建议按单次使用量分装成小规格。并于-20 $^{\circ}$ C(最长可储存 1 个月)或-80 $^{\circ}$ C（最长可储存 1 年）条件下储存。

3. 准备海肾萤光素酶工作液

- 3.1) 将所有组分恢复至室温。
- 3.2) 配置 2 mg/mL Coelenterazine 储存液。400 μ g 组份 E 溶解在 200 μ L 乙醇中。储存液-80 $^{\circ}$ C可以储存 6 个月反复冻融 5 次。
- 3.3) 工作液配置：用组分 D 按照 1:50 稀释以上 coelenterazine 储存液，配制成 0.04 mg/mL 的 1x coelenterazine 工作液。
注：1 \times Coelenterazine 工作液现配现用，配置后在 3 小时内使用。

4. 化学发光值检测

- 4.1) 按仪器操作说明书开启具有检测化学发光功能的仪器如酶标仪。
- 4.2) 每个样品测定时，取样品 20-100 μ L(如果样品量足够，请加入 100 μ L；如果样品量不足可适当减少用量，但检测孔用量需保持一致)。1 \times Lysis Buffer 为空白对照。
- 4.3) 加入 100 μ L 萤火虫萤光素酶检测液，用枪吹打均匀或用其它适当方式混匀后测定 RLU (relative light unit) 值。
注：由于该发光为瞬时发光，建议加入萤火虫萤光素酶工作液后，立即进行检测。
- 4.4) 加入 100 μ L 1 \times Coelenterazine 工作液，用枪吹打均匀或用其它适当方式混匀后测定 RLU (relative light unit) 值。
- 4.5) 在以海肾萤光素酶为内参的情况下，用萤火虫萤光素酶测定得到的 RLU 值除以海肾萤光素酶测定得到的 RLU 值。根据得到的比值来比较不同样品间目的报告基因的激活程度。如果以萤火虫萤光素酶为内参，也可以进行类似计算。

注意事项

- 1) 为取得最佳测定效果，在用单管的化学发光仪测定时，样品和测定试剂混合后到测定前的时间应尽量控制一致；使用具有化学发光测定功能的多功能荧光酶标仪时，宜先把样品全部加好，然后统一加入萤火虫萤光素酶检测试剂。
- 2) 由于温度对酶反应有影响，所以测定时，样品和试剂均需达到室温后再进行测定。

本产品仅作科研用途