

双荧光素报告基因检测试剂盒

货号: DR175

存储条件: -20°C保存, 有效期1年以上。底物溶解后需要保存到-70°C冰箱, 保质期1年有效。或-20°C保存不超过1个月。

产品组分:

组分	100T	1000T
A. Cell Lysis Buffer (5x)	10mL	100mL
B. Firefly Luciferase Reaction Buffer	10mL	100mL
C. Firefly Luciferase substrate	1 vial	1 vial
D. Stop&Renilla Reaction Buffer	10mL	100mL
E. Renilla Luciferase Substrate (50x)	200uL	1mL*2

产品描述

双荧光素酶报告基因检测试剂盒(Dual Luciferase Reporter Gene Assay Kit), 是先以萤光素(luciferin)为底物来检测萤火虫萤光素酶(Firefly luciferase), 后以肠腔素(coelenterazine)为底物来检测海肾萤光素酶(Renilla luciferase), 并且在后续加入海肾萤光素酶底物时, 同时加入抑制萤火虫萤光素酶催化 luciferin 发光的物质, 使后续检测仅仅检测到海肾萤光素酶的活性, 实现双荧光素酶报告基因检测。萤火虫萤光素酶是一种分子量约为 61kD 的蛋白, 在 ATP、镁离子和氧气存在的条件下, 可以催化 luciferin 氧化成 oxyluciferin, 在 luciferin 氧化的过程中, 会发出生物荧光 (bioluminescence)。海肾萤光素酶是一种分子量约为 36kD 的蛋白, 在氧气存在的条件下, 可以催化 coelenterazine 氧化成 coelenteramide, 在 coelenterazine 氧化的过程中也会发出生物荧光。生物荧光可通过化学发光仪(luminometer)或液闪测定仪进行测定。

双荧光素酶报告基因检测试剂盒为检测基因的表达量提供有效的手段, 在 DLR 检测中, 萤火虫萤光素酶 (Firefly luciferase) 和海肾萤光素酶 (Renilla luciferase) 的活性可在单个样品中依次检测。先以萤光素 (Luciferin) 为底物来检测萤火虫萤光素酶的活性, 然后加入抑制萤火虫萤光素酶催化的物质, 同时加入腔肠素 (Coelenterazine) 检测海肾萤光素酶的活性, 实现双荧光素酶报告基因检测。通过萤光素酶和其底物这一生物发光体系, 可以非常灵敏、高效地检测基因的表达。通常把感兴趣基因的转录调控元件或 5' 启动子区克隆在 Luciferase 的上游, 或把 3'-UTR 区克隆在 Luciferase 的下游, 构建成报告基因 (Reporter gene) 质粒, 然后转染细胞, 用适当药物等处理细胞后裂解细胞, 通过检测萤光素酶活性的高低来判断药物处理等对目的基因的转录调控作用。海肾萤光素酶更多地被用作检测转染效率的内参, 以消除细胞数量和转染效率的差异。萤火虫萤光素酶催化 luciferin 发光的最强发光波长为 560nm。海肾萤光素酶催化 coelenterazine 发光的最强发光波长为 465nm。

本试剂盒的光信号可以通过化学发光仪、酶标仪或液闪测定仪进行测定。该试剂盒具有检测迅速、灵敏度高、检测范围广, 无细胞内源性干扰等特点。

操作步骤

(一)自备材料

PBS 溶液; 移液器或排枪; 黑色酶标板; 化学发光仪或酶标仪, 可配自动进样器进行高通量检测。

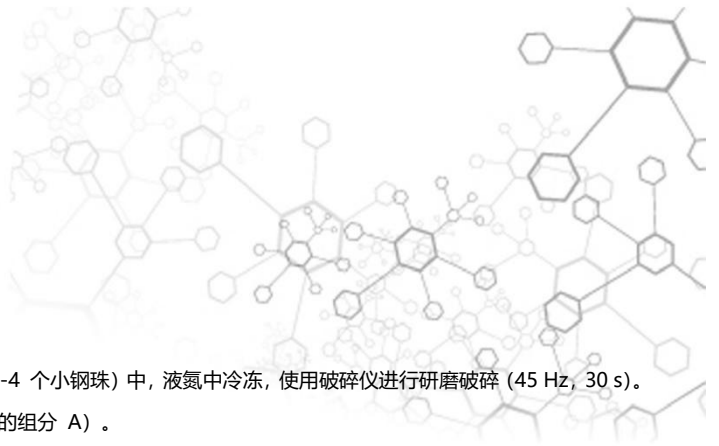
(二)检测前准备

1.首次使用时, 将 Firefly Luciferase Reaction Buffer 一次性全部倒入 Firefly Luciferase substrate 瓶中, 涡旋震荡, 底物充分溶解并混匀后按单次实验需求量进行适当分装, 避光保存于-70°C, 避免反复冻融。

2.每次使用前以 1: 4 比例将 Cell Lysis Buffer (5x) 与 ddH₂O 充分混合, 置于冰上备用。配制体积根据实验需求, 建议现配现用。

3.使用时于冰上避光暂存 Renilla Luciferase Substrate (50x), 计算实际使用量, 以 50: 1 的比例将适量的 Stop&Renilla Reaction Buffer 与 Renilla Luciferase Substrate 混匀, 室温避光备用。建议现配现用, 剩余的反应液当次实验结束后, 直接舍弃, 不要留存。





(三) 操作方法

针对植物组织

1.1 裂解植物组织

- (1) 取 3-4 片直径为 6-8 mm 的叶片，放入 2 ml 的 EP 管 (提前放入 3-4 个小钢珠) 中，液氮中冷冻，使用破碎仪进行研磨破碎 (45 Hz, 30 s)。
- (2) 破碎完全后在 EP 管中加入 100 ul 1x Cell Lysis Buffer (稀释后的组分 A)。
- (3) 冰上孵育 5 min 左右，充分裂解叶片。
- (4) 10000-16000 rpm 离心 1 min，取上清用于后续测定。

1.2 单管动物细胞检测方法

①裂解细胞

a. 贴壁细胞：吸去细胞培养基，用 PBS 缓慢轻柔地洗涤一次，洗去残留的培养基，然后将液体全部吸弃。

悬浮细胞：离心去上清后，清洗细胞一次再次离心收集细胞沉淀

b. 按照下表推荐加入适量的 1x Cell Lysis Buffer，室温下静置或振动摇晃裂解 15min，吹打并吸取全部细胞裂解产物至 1.5mL 离心管中，16000g 离心 5min，取上清用于后续检测。

细胞培养板	6 孔	12 孔	24 孔	48 孔	96 孔
1x 细胞裂解液	500ul	200ul	100ul	50ul	20ul

注：若荧光素酶的表达水平过低，可适当减少细胞裂解液用量以提高蛋白浓度，但需保证裂解液体积可以覆盖细胞孔板底面否则会影响裂解效果。

1.3 荧光检测步骤

② Firefly Luciferase 反应检测

小心吸取 20μL 细胞裂解上清依次加入至检测管或酶标板中，再加入 100μL 平衡至室温的含有底物的 Firefly Luciferase Reaction Buffer，迅速混匀后立即于化学发光仪或酶标仪中检测 firefly Luciferase 报告基因活性。(注：务必将反应缓冲液恢复至室温，使酶促反应在最适温度 25°C 进行。加样后，需要进行混匀，使酶促反应充分稳定进行。本品 Firefly 荧光稳定性可达 30s 以上。)

③ Renilla Luciferase 反应检测

在以上反应液中加入 100μL 现配制的 Renilla 检测工作液迅速混匀后立即于化学发光仪或酶标仪中检测 Renilla Luciferase 报告基因活性。

2.通过自动进样器进行高通量检测方法

①裂解细胞

a. 贴壁细胞：用排枪吸去细胞培养基，PBS 缓慢轻柔地洗涤一次，洗去残留的培养基，然后将液体全部吸弃。

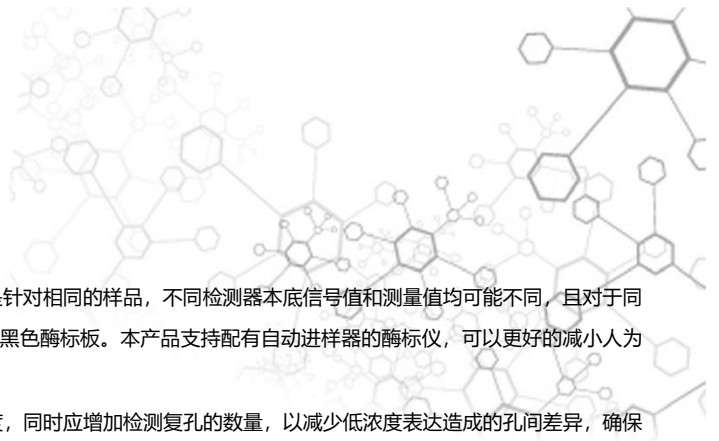
悬浮细胞：参考单管检测细胞收集方法，不适合原位裂解。

b.以 96 孔板为例，用排枪每孔加入 20μL 1x Cell Lysis Buffer，室温下静置或振动摇晃裂解 15min。

②双酶反应检测

按照仪器说明书完成自动进样器的初始化操作，设定自动进样器 1 为溶解底物后的 Firefly Luciferase Reaction Buffer；自动进样器 2 为加入底物的 Stop&Renilla Reaction Buffer。设置检测程序，通过自动进样器 1 加入 100μL 平衡至室温的含有底物的 Firefly Luciferase Reaction Buffer，振板 1-2s 混匀，检测 Firefly Luciferase 报告基因活性。通过自动进样器 2 加入 100μL 的 Renilla 检测工作液，振板 1-2s 混匀，检测 Renilla Luciferase 报告基因活性。以此程序完成 96 孔板的所有样品检测。(注：务必将反应缓冲液恢复至室温，使酶促反应在最适温度 25°C 进行。加样后，需要进行振板混匀，使酶促反应充分稳定进行。本品 Firefly 荧光稳定性可达 30s 以上。)





注意事项

1. 检测仪器选择：能够检测化学发光的仪器都适用本试剂盒的检测，但是针对相同的样品，不同检测器本底信号值和测量值均可能不同，且对于同一样本检测，不同仪器的数值不可横向比较。为防止孔间干扰，推荐使用黑色酶标板。本产品支持配有自动进样器的酶标仪，可以更好的减小人为操作时间造成的孔间差异，具体操作请参考配套的自动进样器说明书。
2. 如果体系中萤光素酶表达量较低，可适当减少裂解用量以提高蛋白浓度，同时应增加检测复孔的数量，以减少低浓度表达造成的孔间差异，确保结果的可靠性。
3. 酶促反应对温度较为敏感，加样检测前务必将细胞裂解产物和检测底物均平衡至室温后使用。
4. 为保证萤光素酶检测试剂稳定性，可采取适当分装后-70℃冰箱避光保存的方法，以避免反复冻融和长时间暴露于室温。检测前根据需要取适量分装后的反应液室温(25℃)水浴复融，充分涡旋混匀后使用。
5. 裂解产物与 Firefly 发光反应液接触后约 30s 内萤光强度较为稳定，为取得最佳检测结果，在使用单管的化学发光仪检测时，不同样品和底物混合后至上机检测的时间间隔应尽量一致；使用具有化学发光测定功能的多功能酶标仪时应先把细胞裂解液在孔内加好，然后采用排枪统一加入检测底物并尽快上机检测。
6. 加入 Stop & Renilla Reaction Buffer 后对于萤火虫萤光素酶的抑制可以达到 99.999%以上，建议通过以下方法提高淬灭效果：使用单管的化学发光检测仪时，加入抑制缓冲溶液后可缓慢吹打混匀 2-3 次即可(切勿吹起大量气泡)；使用多功能酶标仪时，可通过增加混匀振幅或延长振动时间(1-2s)。
7. 使用配有自动进样器的多功能酶标仪进行高通量检测时，注意选择合适的进样速度。加入 Firefly Luciferase Reaction Buffer 应选择低速模式，避免形成大量气泡；加入 Stop&Renilla Reaction Buffer 可以选择略高一些的中速模式，有助于液体充分混匀达到更好的淬灭效果。
8. Renilla Luciferase Substrate (50x) 配制在无水乙醇中。由于无水乙醇容易挥发，有时会在初次使用时发现体积明显小于包装规格的情况，此时用无水乙醇把体积补足至包装规格，并混匀后即可使用。
9. 萤火虫萤光素酶催化的生物发光的最强波长为 560 nm，海肾萤光素酶催化的生物发光的最强波长为 480 nm。

