YGSM200

荧光素酶报告基因检测试剂盒（200T）

一般说明

萤火虫荧光素酶是基因表达中最常用的报告基因之一。这是一种极度灵敏、响应快速且易于使用的报告基因。荧光素酶催化的化学发光反应是测量基因表达最敏感的分析工具之一，本公司生产的荧光素酶报告基因检测法是采用荧光素和ATP作为底物，对哺乳动物、酵母或大肠杆菌细胞中的荧光素酶表达进行定量测定，该反应会产生光，因此可用光度计方便地测量。

反应式：

$$\text{ATP+D-荧光素+ } O_2 \xrightarrow{\text{荧光素酶}} \text{氧化荧光素+ AMP + } PP_i + CO_2 + \text{光}$$

这种生物发光报告基因检测法极其敏感，尤其适用于定量测定重组细胞中的荧光素酶表达水平。这种基于细胞的超敏匀相检测法只需加入一种工作液，在短暂的培养步骤（2分钟）后即可测定荧光强度。可在试管、比色皿或多孔板中完成该检测。试剂盒中的所有试剂都与培养液及所有液体处理系统兼容。由于发射荧光动力学持续时间较长（半衰期40分钟），因此该检测法尤其适合在96孔板、384孔板和1536孔板中进行高通量筛选。试剂盒中提供的试剂配比恰当, 提高了检测的敏感性、可重复性并延长保质期。该试剂盒的适用范围包括基因调节研究和高通量筛选基因调节剂。 可做低至2 fg的荧光素酶及5个细胞的定量分析。

应 用

基因调控: 评判基因表达水平、启动子活性、以及受体、转录因子和小分子对基因表达的调节。

药物研发：高通量筛选基因调节剂。

试剂盒组成

反应试剂	缓冲液
固体	20 mL

储存条件：反应试剂在-20°C 下保存，缓冲液在4°C下保存。

检测步骤

荧光素酶报告基因检测是基于荧光素/荧光素酶反应过程中会产生荧光的原理。优化后的试剂配制可将细胞溶解和检测合并到一个步骤完成。培养液中的酚红并不干扰检测结果。技术要点中的所有数据都是在含有酚红的培养液中测得的。

注：虽然用缓冲液配好的试剂可在-20 °C下保存4周，但仍建议现配现用。

96孔板检测步骤：

1. 在白色不透明的96孔组织培养板中培养细胞（80 µL）。培养液含DMEM、10%胎牛血清和抗生素（青霉素/链霉素、庆大霉素等）。氨基酸和其它营养物也可加入到培养液中。不论是粘附细胞还是悬浮细胞，都可进行检测。可从稳定或瞬时转染细胞中检测荧光素酶基因。尽管本方案中使用80 µL，但培养体积可从50至100µL之间不等。还应准备不含细胞的空白对照孔。

2. 向细胞中加入待测化合物和对照品。混匀，培养至所需的时间。对于基因调节研究，培养时间可从数小时至3天之间不等。建议一式两份或一式三份进行检测。建议将20 µL体积的待测化合物溶解到PBS溶液或培养液中。

3. 配制试剂。首先将反应试剂和缓冲液放置至室温，然后用吸液器移取少量（如 1 mL）缓冲液至装有反应试剂的试管中。轻轻振荡试管，将配制好的溶液移至装有缓冲液的瓶内。重复以上步骤直至将所有试剂都移至装有缓冲液的瓶内。翻转试剂瓶使其混合，直到试剂完全溶解。

4. 将100 µL 配好的反应试剂（每80 µL细胞培养液）加入到各孔中，与细胞混匀。室温下培养2分钟。可根据细胞培养液的体积调整所加试剂的体积。

5. 用光度计测量光强度。根据荧光素酶的表达水平和仪器的敏感度，时间可在1秒至2分钟之间不等。对于大多数光度计， 1至5秒都是合适的。

384孔板测定步骤：

1. 在白色不透明的 384 孔组织培养板中培养细胞（25 µL）。尽管本方案中使用 25 µL，但培养体积可从 20 至 50µL 之间不等。准备不含细胞的空白对照孔。
2. 向细胞中加入待测化合物和对照品。混匀，培养至所需的时间。建议将 5 µL 体积的待测化合物加入到 PBS 溶液或培养液中。
3. 试剂配制步骤同 96 孔板检测。
4. 将 30µL 配好的反应试剂（每 25µL 细胞培养液）加入到各孔中，与细胞混匀。室温下培养 2 分钟。可根据细胞培养液的体积调整所加试剂的体积。
5. 用光度计测量光强度。根据荧光素酶的表达水平和仪器的敏感度，时间可在 1 秒至 2 分钟之间不等。对于大多数光度计， 1 至 5 都是合适的。

总 则

培养时间：荧光素/荧光素酶反应及细胞溶解的过程都很快，所以加入试剂后培养2至10分钟对于哺乳动物细胞来说是足够的。

细胞数量：优化后的报告基因检测试剂对荧光素酶非常敏感（低至2 fg），且线性范围达7个数量级。可测定低至5个细胞，并且当96孔板的每个孔中有多达80,000个细胞时仍可观察到线性相应关系。为了优化检测，建议根据细胞连续稀释来确定每孔的最佳细胞数量。细胞可以是粘附细胞或悬浮细胞。

细胞溶解与混合：为了操作方便，将1份配好的试剂加入到1份细胞中可确保混合充分。由于试剂盒特别配备的缓冲液可立刻溶解哺乳动物细胞，因此无需其它混合步骤。

数据分析

荧光强度（RLU）直接与荧光素酶的浓度成正比。对于剂量反应研究，可绘制检测数据与化合物浓度的曲线。

预防措施：本产品仅供研究用，使用过程中应严格遵循实验安全措施。