



## Dual Luciferase Reporter Gene Assay Kit 双萤光素酶报告基因检测试剂盒

### 产品简介

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) [1]。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。生物荧光可以通过化学发光仪(luminometer)或闪电测定仪进行测定[2]。本试剂盒的检测原理参考图 2。

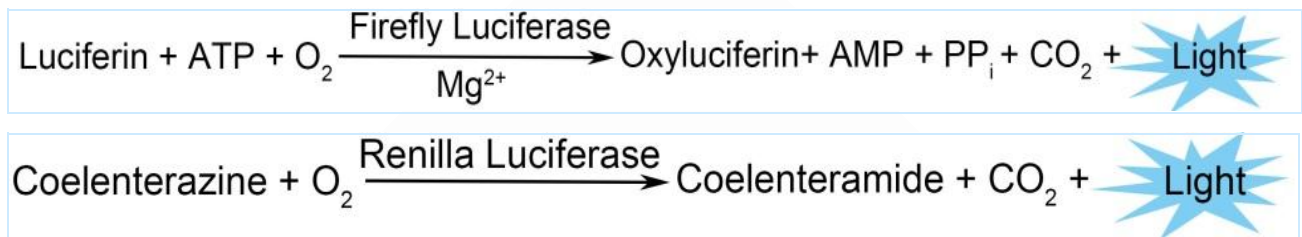


图 2. 双萤光素酶的检测原理图。

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 的下游等, 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, 测定萤光素酶活性。通过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。Renilla luciferase 相对更多地被用作转染效率的内参, 以消除细胞数量和转染效率的差异。

双萤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, 该物质可以淬灭约 99.9%以上的萤火虫萤光素酶信号, 使后续检测仅仅检测到海肾萤光素酶的活性, 从而实现双萤光素酶报告基因检测。

萤光素、萤光素酶、萤火虫萤光素酶和海肾萤光素酶也经常被称作荧光素、荧光素酶、萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶。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。

本产品操作简单, 读数稳定, 检测速度快, 从样品制备到完成整个检测过程仅需约 25 分钟。本试剂盒中提供的萤火虫萤光素酶检测试剂为即用型试剂, 海肾萤光素酶检测底物和海肾萤光素酶检测缓冲液按照 1:100 的比例混合即可配制成海肾萤光素酶检测工作液, 再各取 100 微升先后与 20-100 微升裂解制备的细胞样品混合后即可立即进行化学发光检测。并且化学发光比较稳定, 萤火虫萤光素酶的信号半衰期约 15 分钟, 海肾萤光素酶的信号半衰期约 200 秒。

本产品的海肾萤光素酶检测工作液对萤火虫萤光素酶的淬灭效果好。本试剂盒中的海肾萤光素酶检测缓冲液和海肾萤光素酶检测底物配制的海肾萤光素酶检测工作液含有抑制萤火虫萤光素酶催化 luciferin 发光的物质, 海肾萤光素酶检测试剂加入后通过简单的混匀, 就可以抑制 99.9%以上的萤火虫萤光素酶催化的发光信号, 大大提高了后续海肾萤光素酶活性检测的精准性。

本产品稳定性好。本试剂盒中的萤火虫萤光素酶检测试剂、海肾萤光素酶检测缓冲液和海肾萤光素酶检测底物(100X)的稳定性均较好。萤火虫萤光素酶检测试剂反复冻融 5 次对检测效果基本无影响, 反复冻融 10 次检测效果下降不超过 10%; 4°C 条件下, 保存 3 天检测效果下降不超过 20%, 保存 5 天检测效果下降不超过 30%, 保存 7 天仍可保留 60%以上的检测效



果；室温保存 1 天可保留 70% 以上的检测效果，保存 3 天可保留 60% 以上的检测效果；37°C 保存 1 天可保留 50% 以上的检测效果。海肾萤光素酶检测缓冲液反复冻融 10 次、4°C 和室温保存 3 天、37°C 保存 1 天对检测效果的影响均不超过 5%。海肾萤光素酶检测缓冲液反复冻融 10 次、4°C 或室温保存 3 天对检测效果基本无影响，37°C 保存 1 天对检测效果的影响不超过 5%。海肾萤光素酶检测底物(100X)在 4°C 保存 1 周、室温保存 1 天检测效果下降不到 10%，室温保存 3 天、37°C 保存 1 天，仍可保留 80% 以上的活力。本试剂盒可以测定 100 个样品。

#### 产品组成

组分	产品货号	FS0569-100T	
		Dual Luciferase Reporter Gene Assay Kit 双萤光素酶报告基因检测试剂盒	
		<b>100T</b>	<b>Storage</b>
试剂 A: 报告基因细胞裂解液		<b>60ml</b>	-20°C 保存一年有效, -80°C 可以长期保存
试剂 B: 萤火虫萤光素酶检测试剂		<b>10ml</b>	-80°C 避光保存
试剂 C: 海肾萤光素酶检测缓冲液		<b>10ml</b>	-20°C 保存一年有效, -80°C 可以长期保存
试剂 D: 海肾萤光素酶检测底物(100X)		<b>100ul</b>	-80°C 避光保存
使用说明书			1 份

保存及运输：报告基因细胞裂解液和海肾萤光素酶检测缓冲液在 4°C 保存 3 个月有效，-20°C 保存一年有效，-80°C 可以长期保存。萤火虫萤光素酶检测试剂-80°C 避光保存，至少一年有效；-20°C 避光保存，推荐 3-6 个月内使用。海肾萤光素酶检测底物(100X)在-20°C 避光保存 6 个月有效，-80°C 避光保存一年有效。

#### 使用方法

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。

a. 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。

器皿类型	96 孔板	48 孔板	24 孔板	12 孔板	6 孔板
报告基因细胞裂解液(微升/孔)	100	150	200	300	500

注：如果萤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 微升。

b. 充分裂解后，10,000-15,000×g 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萤光素酶，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. 融解萤火虫萤光素酶检测试剂和海肾萤光素酶检测缓冲液，并达到室温。海肾萤光素酶检测底物(100X)置于冰浴或冰盒上备用。

3. 按照每个样品需 100 微升的量，取适量海肾萤光素酶检测缓冲液，按照 1:100 加入海肾萤光素酶检测底物(100X)配制成海肾萤光素酶检测工作液。例如，1 毫升海肾萤光素酶检测缓冲液中加入 10 微升海肾萤光素酶检测底物(100X)充分混匀后即可配制成约 1 毫升海肾萤光素酶检测工作液。

4. 按仪器操作说明书开启化学发光仪或具有检测化学发光功能的多功能酶标仪，可以将测定间隔设为 2 秒，测定时间设为 10 秒，或者根据仪器设备的要求并根据实验需要设置适当的间隔时间和测定时间。

5. 每个样品测定时，取样品 20-100 微升(如果样品量足够，请加入 100 微升；如果样品量不足可以适当减少用量，但同批样品的使用量宜保持一致)，取等体积的报告基因细胞裂解液作为空白对照。



- 6.加入 100 微升萤火虫萤光素酶检测试剂，用枪打匀或用其它适当方式混匀后测定 RLU (relative light unit)。
- 7.在完成上述测定萤火虫萤光素酶步骤后，加入 100 微升海肾萤光素酶检测工作液，用枪打匀或用其它适当方式混匀后测定 RLU (relative light unit)。本试剂盒的检测效果可以参考图 1。
- 8.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。

#### 常见问题

##### 1.Luminometer 和荧光分光光度计有何不同？

荧光分光光度计检测的样品本身不能发光，样品需要由特定波长的激发光激发，然后才能产生荧光并被荧光分光光度计检测。Luminometer 检测的样品本身可以发光，不需要激发光进行激发。也就是说 luminometer 是检测化学发光(萤光)的仪器。有些型号的荧光分光光度计也具有 luminometer 的功能，即也可以检测化学发光。您所使用的荧光分光光度计能否用于化学发光的测定请仔细阅读该仪器的说明书。

##### 2.可以进行 ATP 化学发光检测的仪器是否就可以用于本试剂盒的检测？

是。ATP 化学发光的检测原理和本试剂盒的原理相同，可以用相同的仪器测定。

#### 注意事项

- 1) 加入海肾萤光素酶检测工作液后对于上一步骤中的萤火虫萤光素酶的抑制可以达到约 99.9%以上。但总会残留微量活性，因此，宜在转染时把海肾萤光素酶的表达量控制在其 RLU 读数高于萤火虫萤光素酶 RLU 读数的 10%。海肾萤光素酶的读数高于萤火虫萤光素酶的读数是完全可以的，通常不会有明显的负面影响。
- 2) 本试剂盒的海肾萤光素酶检测缓冲液在反复冻融过程中，可能会导致检测试剂中出现少量沉淀，此时宜平衡至室温，并尽量溶解。如仍有残留的不溶物，混匀后直接使用，经测试通常不会影响后续的检测效果。
- 3) 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在相同的时间内，例如 30 秒内；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。
- 4) 由于萤光素酶的活性对温度比较敏感，所以反应前样品和检测试剂均需达到室温后再进行测定。可将萤火虫萤光素酶检测试剂和海肾萤光素酶检测缓冲液在室温或不超过 25°C 的水浴中融解并混匀后使用。
- 5) 尽管经测试本试剂盒中的萤火虫萤光素酶检测试剂反复冻融 5 次对其检测效果无明显影响，为保证萤火虫萤光素酶检测试剂的稳定性、取得良好的检测效果，第一次解冻后可以采取适当分装后避光保存的方法，以避免反复冻融和长时间暴露于室温。
- 6) 样品和测定试剂混合后，必须等待 1-2 秒，再进行测定。测定时间通常为 10 秒，根据情况也可以测定更长或更短时间，但是同一批样品宜使用相同的测定时间。
- 7) 检测时需使用白色或黑色的 96 孔板。如果使用普通透明的 96 孔板，相邻孔之间会产生相互干扰。
- 8) 海肾萤光素酶检测底物(100X)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 100 $\mu$ l 的情况，此时用无水乙醇把体积补足至 100 $\mu$ l，并混匀后即可使用。
- 9) 试剂盒含有毒组分，为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。